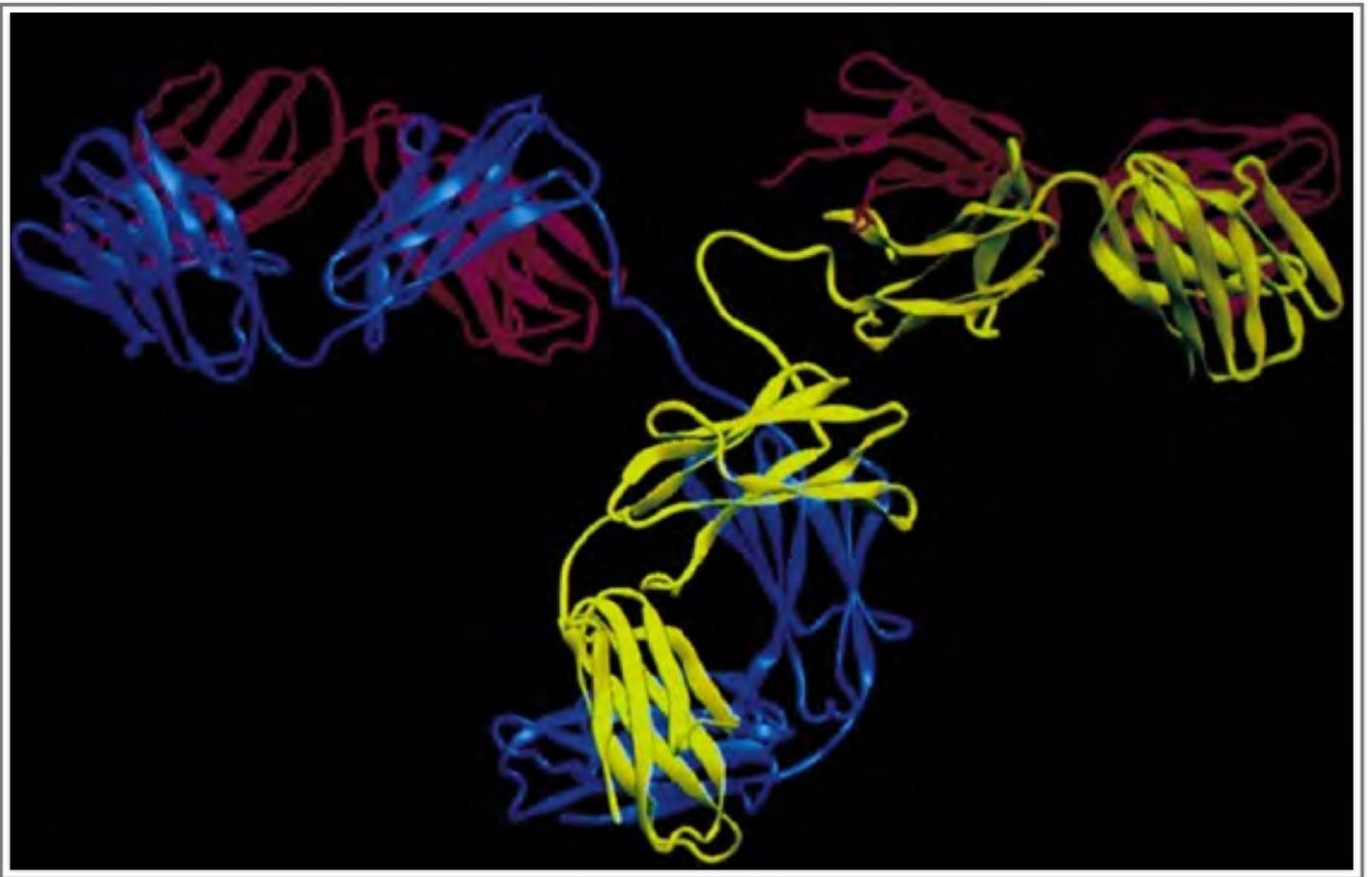


Immunologia



NT

Capitolo 1

Caratteristiche generali della risposta immunitaria

Con il termine IMMUNITA' si indica la protezione dalle malattie , le quali possono essere di natura infettiva o causate da sostanze estranee di natura non infettiva .

L'insieme delle cellule , tessuti e molecole responsabili dell'immunità si definisce : SISTEMA IMMUNITARIO .

La sequenza di reazioni che si verificano in seguito al legame tra le cellule e/o le molecole del sistema immunitario con l'elemento estraneo si definisce : RISPOSTA IMMUNITARIA .

Le componenti del sistema immunitario sono cellule , organi linfoidei e molecole con la funzione di difendere l'organismo contro agenti estranei riconosciuti come patogeni e di eliminare le cellule alterate . Vediamo molecole come Ig , l'MHC , il sistema del complemento , le citochine ; cellule immunitarie , i linfociti T e B e cellule accessorie dell'immunità come granulociti , monociti/ macrofagi , cellule NK e cellule dendritiche (DC) ; gli organi sono primari (timo e midollo osseo) e secondari (milza , linfonodi e tessuti associati alle mucose) .

Il sistema immunitario in condizioni di patologia può reagire contro sostanze innocue (allergia) o contro cellule dell'organismo stesso (autoimmunità) o avere risposte inefficaci o assenti (immunodeficienza) .

La risposta immunitaria si divide in Innata (presente sin dalla nascita) e Acquisita (si verifica solamente in risposta ad una infezione o un agente estraneo) .

L'Immunità innata o naturale agisce immediatamente e costituisce la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni ed è Aspecifica .

L'immunità acquisita , si sviluppa più lentamente ed è Specifica , cioè reagisce nei confronti di una determinata sostanza estranea all'organismo , definita antigene . L'antigene è una molecola (tossina batterica , farmaco) un microrganismo (batterio , virus , parassita) od una cellula che non appartiene ad un organismo ed è quindi estranea . Tutte le molecole o le cellule di uno stesso organismo si definiscono SELF , mentre le molecole , i patogeni e le cellule estranee e/o alterate si definiscono NON SELF.

L'immunità innata è antigene-Indipendente , non è antigene specifica , ha una risposta rapida e non ha memoria , mentre la specifica è antigene-Dipendente, Antigene specifica , ha una certa latenza e ha memoria .

I componenti dell'Innata sono di tipo umorale (complemento,lisozima , citochine infiammatorie) e di tipo cellulare (macrofagi , granulociti , NK , DC) . Lo stesso vale per l'Acquisita , per la componente umorale abbiamo gli anticorpi e per la cellulare , i linfociti T e B .

L'immunoprofilassi è il sistema per difendersi a priori dalle malattie e ne individuiamo una passiva , attraverso l'inoculazione di anticorpi in soggetti malati (può scatenare la risposta autoimmune) e ne individuiamo una attiva , che prevede la vaccinazione (inoculato l'antigene infettivo denaturato che innescava la risposta acquisita) .

Capitolo 2

Immunità Innata

Sono la prima linea di difesa contro le Infezioni ; è in grado di prevenire , controllare o eliminare l'infezione , ma la funzione non è solamente questa , è anche quella di svegliare il sistema immunitario adattativo .

Come l'immunità innata riconosce i patogeni

Il sistema immunitario riconosce delle strutture peculiari dei microrganismi , un numero limitato di prodotti batterici ; è attrezzato per riconoscere profili molecolari associati ai patogeni **PAMP** e i recettori che riconoscono questi profili vengono detti **PRR** o recettori per il riconoscimento di profili ; questi PAMPs possono essere acidi nucleici , N-formilmetionina , LPS , peptidoglicano , RNA a doppia elica , residui di mannosio , acidi teicoici , tutte strutture che all'interno non esistono .

Se i recettori sono espressi sulla superficie cellulare o all'interno di una cellula , allora segnalano un'infezione , mentre se i PRR sono solubili o si trovano sulla membrana di cellule fagocitiche , allora inducono fagocitosi o endocitosi .

L'immunità innata riconosce dei prodotti microbici che spesso sono essenziali per la sopravvivenza del patogeno . I recettori sono di varia natura , possono essere recettori di membrana , intracellulari o proteine solubili ; i recettori dell'immunità innata sono codificati nella linea germinativa , mentre i Linfociti T e B , le cellule proprie dell'immunità specifica , oltre alla linea germinativa , a livello dei

propri recettori subiscono delle ricombinazioni casuali che aumentano grandemente la variabilità recettoriale, andando a riconoscere molti più antigeni rispetto all'immunità innata; l'immunità innata riconosce i PAMP (10^3), mentre la specifica, grazie al riarrangiamento genico, riconosce circa 10^7 antigeni diversi.

Oltre a ciò l'immunità ha il ruolo di riconoscere ed eliminare quelle proteine proprie del corpo umano che sono danneggiate o stressate; queste molecole normalmente sono espresse all'interno della cellula, ma se danneggiate sono espresse fuori, quindi vengono riconosciute ed eliminate.

- Recettori che riconoscono i PAMP

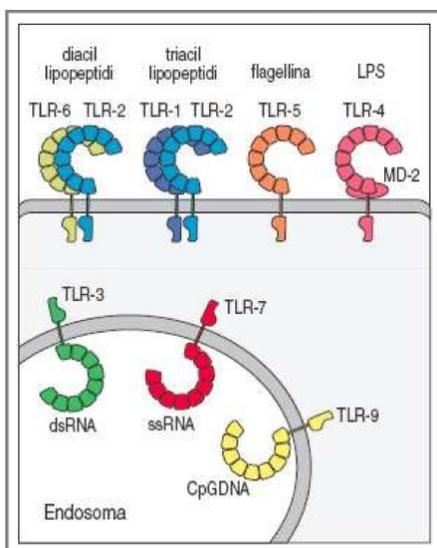
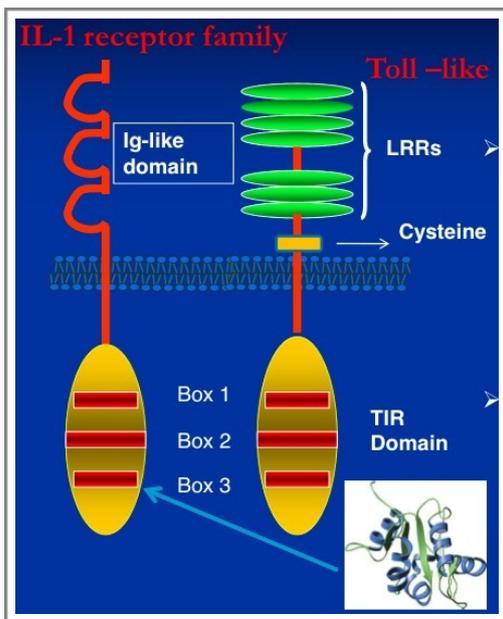
Esistono varietà di recettori, alcuni intracellulari come detto, altri solubili ma la maggior parte però viene espressa sulla superficie cellulare, dove contribuiranno alla trasduzione del segnale.

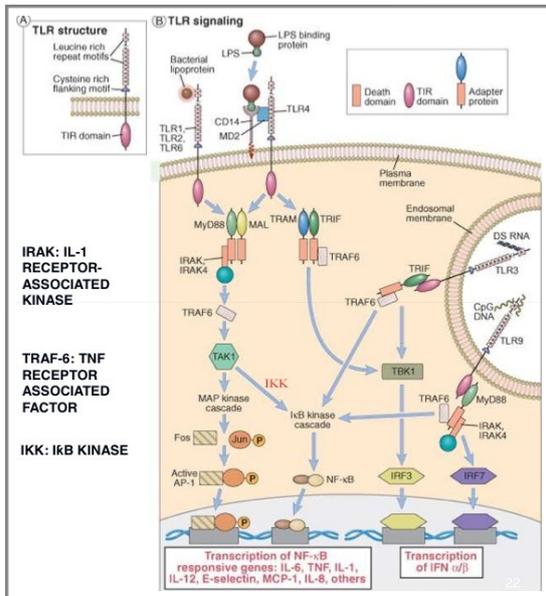
Riconosciamo tre classi di maggiore rilevanza, come TLR, NLR e RIG-I-Like Receptors

1) I più importanti sono i **Toll Like Receptors (TLR)**; questa è una famiglia di 11 recettori che

hanno in comune un dominio altamente conservato intracellulare Toll interleuchina-1 Receptor **TIR**, poi un dominio extracellulare con domini ricchi di leucina (LRRs) ripetuti e regioni ricche di cisteina; Toll Like perché Toll è il nome di un gene individuato nella *Drosophila* responsabile dell'embriogenesi di questa e i Toll Like receptors vengono espressi da macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili e cellule epiteliali delle mucose e cellule endoteliali. Il legame del TLR all'LPS è mediato dal CD14 e potenziato dalla proteina della fase acuta LBP(LPS-binding protein). I TLR riconoscono molecole diverse che sono espresse da microbi, come LPS, peptidoglicani, lipoproteine, acido lipoteicoico, zymosan, flagellina, RNA a doppia elica e singola elica, DNA circolare. I

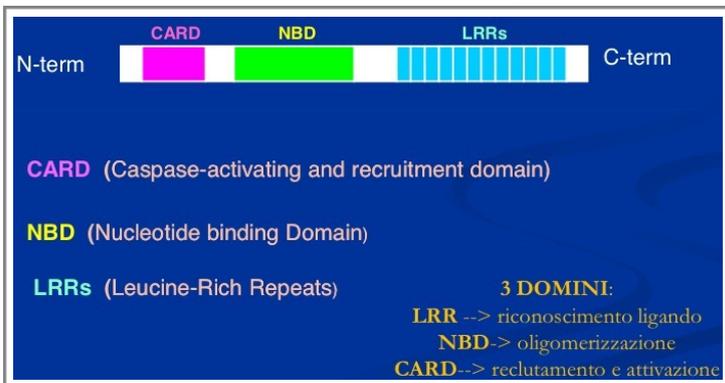
TLR 3,7,8 e 9 hanno prevalentemente una localizzazione intracellulare sul Reticolo Endoplasmatico e sulle membrane endosomiali dove riconoscono gli acidi nucleici dei microbi; nonostante gli acidi nucleici possono ritrovarsi anche nell'ospite, loro riescono a discriminare tra self e non self, non in base alla loro struttura, ma in base alla localizzazione dei loro ligandi, perché normalmente gli acidi nucleici non sono localizzati negli endosomi. La trasduzione del segnale inizia con la dimerizzazione dei TLR indotta dal riconoscimento dei ligandi e poi segue con un reclutamento di proteine adattatrici che contengono il dominio TIR





. Le principali vie di trasduzione del segnale porteranno all'attivazione di fattori di trascrizione come NF-κB o AP-1 , oppure IRF-3 e IRF-7 , tutti fattori che andranno a stimolare l'espressione di geni che normalmente sono silenti e che serviranno per scatenare la risposta immunitaria , come citochine infiammatorie , chemochine . IRF-3 e -7 portano alla trascrizione dei geni per gli interferoni alfa e beta (gli Interferoni sono importanti per la interferenza virale , perché andranno a bloccare la replicazione virale , e questi TLR intracellulari riconoscono l'acido nucleico virale e quindi vengono prodotti Interferoni (I tipo) per contrastare il virus) ; i geni per NF-κB portano alla trascrizione per chemochine e

citochine infiammatorie come TNF-alfa , IL-1 , IL-6 , per molecole di adesione come la E-Selectina e per l'espressione di molecole costimolatorie come B7-1 e B7-2 . [Trasduzione mediata dai TLR : l'LPS va a legare la LBP (LPS binding protein) che faciliterà il legame con una proteina solubile CD14 per formare un complesso LPS-CD14 , infatti LPB si dissocia ; questo complesso legherà il TLR4 che dimerizza e perciò può legare delle proteine adattatrici come MyD88 , Mal , TRIF e TRAM , le quali andranno ad interagire con delle chinasi associate al recettore IL-1 , IRAK , che attivano TRAF-6 ; TRAF-6 è un fattore di trascrizione associato al TNF che attiva la chinasi 1-attivata da TGF-Beta o TAK-1 , che da inizio alla cascata di attivazione delle chinasi , con inibizione di IκB , il principale inibitore dei fattori di trascrizione per Ap-1 e NF-κB , che quindi saranno liberi di aumentare la trascrizione di questi geni .]



2) I **NLR** (NOD Like Receptors) sono proteine citoplasmatiche , che fungono da sensori dell'infezione batterica . Un sottogruppo prende il nome di Nod (nucleotide-binding oligomerization domain) , mentre un'altra NALP . Tre NLR ,

Nod1 e 2 , più NALP3 riconoscono i derivati del peptidoglicano , e una volta avvenuto il riconoscimento , promuovono la risposta innata e viene avviata la trasduzione per il segnale che viene mediata questa volta da **RICK** che porta all'attivazione di AP-1 e NF-κB . Nod1 è un dipeptide che riconosce i batteri gram negativi , mentre Nod2 riconosce non solo i negativi , ma anche i batteri gram positivi . Deficit in questo recettore NOD2 possono portare a due patologie principalmente : il Morbo di Crohn e la Sindrome di Blau o Sarcoidosi ad esordio precoce . La Sarcoidosi è una rara patologia con eritema cutaneo , artrite , uveite e formazione di granulomi ; le mutazioni di NOD2 associate a questa sindrome sono localizzate nel gene CARD e rendono

NOD2 sempre attivo , anche in assenza di stimolo , quindi ci sarà una continua attivazione di NF-kB . Il Morbo di Crohn è una patologia multifattoriale grave a carico dell'intestino , dove si riscontra infiammazione transmurale a chiazze lungo tutto il tratto gastrointestinale , sintomi extra-intestinali a carico di cute , articolazioni e occhi e il rischio di sviluppare tumore colonrettale . Esistono tre varianti di NOD2 che conferiscono una maggiore suscettibilità a questo morbo , e sono localizzate nel LRR del gene NOD2 e non è in grado di modulare l'attivazione del NF-kB . In un individuo sano l'attivazione di NF-kB da parte di TLR2 è limitata dall'azione di NOD2 . In un individuo affetto da morbo di Crohn , il NOD2 non esercita la sua funzione modulatrice , quindi TLR2 induce un'eccessiva attivazione di NF-kB che fa aumentare nell'APC la trascrizione di IL-12 e IL-23 (un membro della famiglia di IL-12) . L'IL-12 secreto dall'APC si lega all'IL-12R del linfocita Th1 , il quale fa aumentare il rilascio di IFN-gamma ; l'IL-23 induce i linfociti Th a differenziare in Th17 , cioè in una popolazione capace di rilasciare IL-17 ed è coinvolta nei processi infiammatori cronici e in alcune malattie autoimmuni . NOD2 ha un duplice ruolo : quando viene stimolato da solo attiva il fattore NF-kB ; quando viene stimolato insieme al TLR2 il NOD2 , riduce l'attivazione di NF-kB da parte di TLR2 e quindi NOD2 è un modulatore negativo del segnale di TLR2 .

- 3) **RLR** (RIG-I like helicases) sono recettori che legano RNA virale , attraverso i loro domini CARD , RIG-I , MDA5 , LGP2 che avviano una trasduzione che porta all'attivazione di IRF-3 e NF-kB , quindi ad un incremento di produzione di IFN-gamma

- Altri PRR

Le Lectine di tipo C , che legano i carboidrati e sono espresse sulla membrana dei macrofagi , leucociti e cellule dendritiche ; vediamo il recettore per il mannosio per la fagocitosi dei microbi .

I recettori **scavenger** (spazzini) che mediano l'ingresso di lipoproteine ossidate all'interno delle cellule ; mediano l'ingresso dei microbi all'interno dei fagociti , ma sono importanti anche nei processi patologici come l'aterosclerosi .

I recettori come FPR e FPRL1 che riconoscono peptidi corti con residui di N-Formilmetionina .

Vediamo infine dei recettori solubili dei quali fanno parte le collectine , come la MBL e poi proteine surfattanti SP-A e SP-D nel polmone dove riconoscono il mannosio . Tra le solubili ci sono anche proteine della fase acuta , come la proteina C-reattiva , che riconosce la fosfolipina dei polisaccaridi .

Componenti dell'Immunità Innata

- 1) Barriere Epiteliali

La superficie epiteliale è una prima linea di difesa contro gli agenti infettivi , una barriera tra l'ambiente esterno e i tessuti , e non sono un tessuto statico , in quanto come alcuni leucociti , vanno a produrre dei peptidi con funzione antibiotica , come :

Defensine : dei peptidi cationici , ed il principale produttore è la cellula di Paneth nelle crypte dell'intestino tenue , dove limitano la quantità di microbi nel lume .

Catelicidine espresse da epitelio di barriera e neutrofili , direttamente tossico per un'ampia gamma di microrganismi e attiva i leucociti ; hanno un frammento C-Terminale LL-37 che riconosce e neutralizza l'LPS .

Le barriere epiteliali e le cavità sierose inoltre contengono dei linfociti T intraepiteliali e i linfociti B-1 . Queste sono delle sottopopolazioni con un recettore caratterizzato da una limitata diversificazione , infatti non riconoscono una vasta quantità di antigeni , ma solamente i PAMP (avviene perché la ricombinazione non porta grandi modificazioni dei recettori dalla linea germinativa) ; gli intraepiteliali sono presenti nelle mucose e nell'epidermide ; i linfociti B-1 producono anticorpi naturali nell'intestino tenue .

- 2) Fagociti

- **Neutrofili** o CD66 mediano le prime fasi dell'infiammazione . Chiamati anche PMN polimorfonucleati rappresentano circa il 70% del pool leucocitario circolante . Sono cellule tondeggianti di 12 micrometri di diametro , con un nucleo segmentato in 3-5 lobuli (il numero di lobuli dipende dall'emivita , meno lobuli avrà , più sarà giovane) . Ha dei granuli di due tipi , primari che contengono enzimi come il lisozima , la mieloperossidasi ed enzimi proteolitici , mentre i secondi contengono lattoferrina , collagenasi , defensine . Sono le prime cellule che rispondono agli stimoli chemiotattici e che raggiungono il sito di infiammazione . Non si colorano né con coloranti acidi , né basici , donde il nome neutrofili . Sono prodotti nel midollo osseo e la loro produzione è stimolata da una citochina , o G-CSF . Hanno un'emivita di 6 ore e se non vengono reclutati nel giro di questo tempo , vengono fagocitati dai macrofagi nel fegato e nella milza . Sono specializzati nell'uccisione di microbi extracellulari .

- Eosinofili , presenti nel sangue e tessuti , con nucleo bilobato , sono coinvolti nell'ipersensibilità di tipo I , possiedono recettori per IgE . Producono istaminasi e arilsulfatasi .(vedi capitolo 19)

- Basofili e mastociti . I primi presenti nel sangue , i mastociti nel tessuto connettivo , contengono istamina ed eparina ed innescano la risposta infiammatoria e l'ipersensibilità di tipo I .(vedi 19)

- Fagociti Mononucleati che comprendono cellule di derivazione comune , il monocito di 12 micrometri , che poi differenzierà nelle sedi dove andrà a svolgere la propria funzione e cambierà il proprio nome . La cellula più rilevante è senz'altro il **macrofago** , di 20-50 micrometri che può anche fondersi con altri macrofagi per adempiere alle sue funzioni , ossia la fagocitosi . Nel sistema

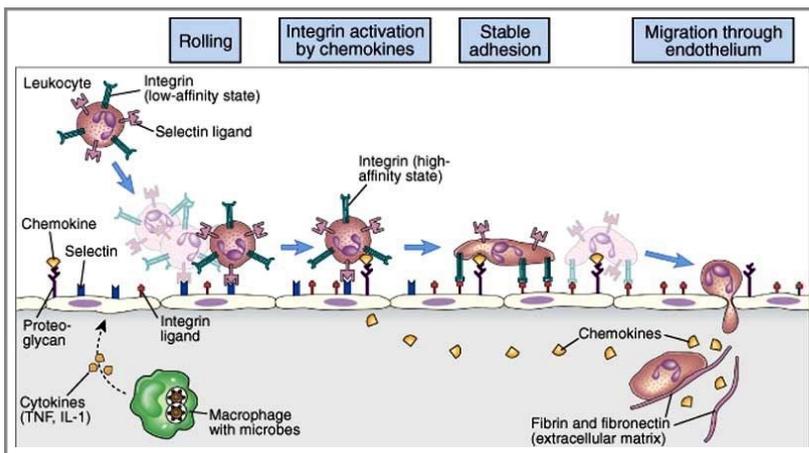
nervoso si parla di microglia , nel fegato di cellula di Kupffer , nelle vie polmonari macrofagi alveolari e nel tessuto osseo si parla di osteoclasti . Hanno marcatori come **CD14** e **CD68**(specifico) . Hanno un diametro di 20-50 micron .

- **Cellule dendritiche DC** , servono a collegare l'immunità innata con l'immunità acquisita , in quanto dotati della capacità di riconoscere il patogeno e presentarlo nelle opportune sedi alle cellule dell'immunità acquisita , per attivare la risposta specifica . Esprimono **PAMP** e secernono citochine . Hanno prolungamenti ramificati a denotare la loro funzione di pattugliare l'organismo in cerca del patogeno . Sono caratterizzate dalla presenza di prolungamenti ramificati del citoplasma . Si distinguono due tipi cellulari con origini e funzioni differenti :

-1) Cellule dendritiche di derivazione mieloide , esprimono i recettori **PRR** , processano e presentano l'antigene proteico ai linfociti T **CD4+** e sono le cellule di Langerhans (disseminate lungo tutta l'epidermide captando antigeni penetrati attraverso la cute per trasportarli ai linfonodi drenanti e non sono capaci di stimolare i linfociti T pertanto sono dette immature) ; le cellule dendritiche interdigitate (presenti nelle aree T dei linfonodi e della milza) ; le dendritiche interstiziali (molti organi) .

-2) Cellule follicolari dendritiche o **FDC** presenti nei centri germinativi dei follicoli linfatici linfonodali e splenici , nonché nei tessuti linfoide associati alle mucose o zone B , che trattengono complessi antigene-anticorpo .

- Reclutamento dei leucociti nei siti di infezione :



Si svolge in 4 tappe fondamentali .

- 1) Rotolamento : In risposta ai microbi e alle citochine prodotte dalle cellule in risposta ai microbi , le cellule a endotelio alto che rivestono le venule post capillari nei siti di infezione aumentano l'espressione di selectine . Vengono prodotte citochine come **IL-1** e **TNF-alfa** da parte dei macrofagi che hanno riconosciuto un patogeno , le quali andranno a stimolare queste cellule

endoteliali ad esprimere le Selectine . La Selectina **P** inizialmente , dopo il riconoscimento microbico e poi la Selectina **E** dopo la stimolazione delle citochine . Viene poi espressa una terza selectina , **L** (**CD62L**) , sui linfociti e leucociti . Le **L** selectine serviranno alle cellule del sistema immunitario per legare l'endotelio presente nei siti di infiammazione . Le interazioni selectine-ligandi sono in questa

fase a bassa affinità , con una rapida cinetica di dissociazione , e facilmente dissipate dalla pressione arteriosa . Il risultato sarà che i legami si formano e si rompono velocemente , in modo tale da far rotolare queste cellule sull'endotelio e permettendo l'espressione di successive molecole di adesione . I leucociti rotolano fino a che non arrivano ad un punto in cui le chemochine che li stanno richiamando sono più concentrate .

- 2) Aumento dell'affinità delle integrine mediato da chemochine

Le chemochine vengono prodotte nel sito di infezione in risposta al TNF e IL-1 . Queste vengono espresse sulla superficie dell'endotelio e vanno a legarsi ai recettori presenti sui leucociti che rotolano sull'endotelio . I leucociti esprimono le integrine , che su cellule non attivate sono in uno stato di bassa affinità e quindi incapaci di aderire, , ma il segnale fornito dalle chemochine , induce ad aumentare la loro affinità e promuovere l'aumento dell'avidità del legame sulla superficie endoteliale .

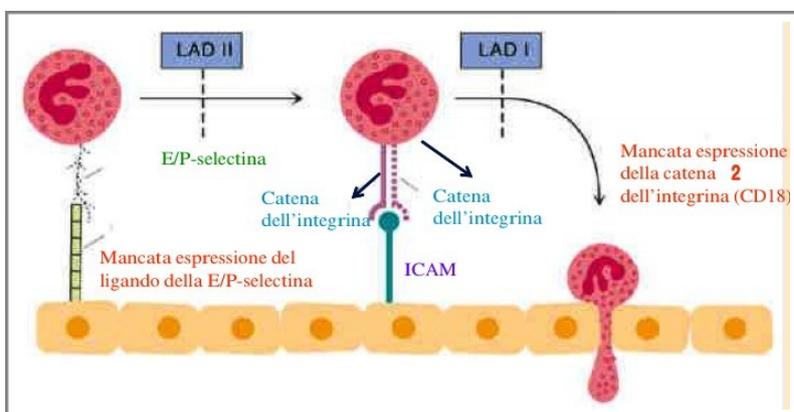
- 3) Adesione stabile dei leucociti all'endotelio mediata dalle integrine

Parallelamente all'attivazione delle integrine e alla loro modificazione , TNF e IL-1 non hanno solamente promosso l'espressione delle selectine , ma anche dei ligandi per le integrine sull'endotelio . In particolare viene espressa la **VCAM-1** (molecola di adesione vascolare-1) e la **ICAM-1**(molecola di adesione intercellulare-1) . La prima andrà a riconoscere **VLA-4** e la seconda **LFA-1** e **Mac-1** sui leucociti . Il risultato finale è l'adesione stabile .

- 4) Trasmigrazione dei leucociti attraverso l'endotelio

Le chemochine agiscono sui leucociti aderenti stimolandoli a migrare attraverso un gradiente chimico di concentrazione , la sede di infezione . Un'adesione stabile causa l'appiattimento e la migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio .

Le molecole coinvolte in queste migrazioni variano da tipo cellulare a tipo cellulare , infatti per i neutrofilii vediamo interazioni LFA-1:ICAM-1 e chemochine CXCL:recettori CXCR1 e 2 ; per i monociti le molecole coinvolte sono VLA-4:VCAM-1 e la chemochina CCL2:recettoreCCR2 .



Mutazioni a carico del gene che codifica per il ligando della E/P-selectina , porta ad inibizione del rolling e infezioni ricorrenti , una difettiva adesione leucocitaria LAD , autosomica recessiva (cromosoma 21) , con inibizione della diapedesi ed infezioni ricorrenti .

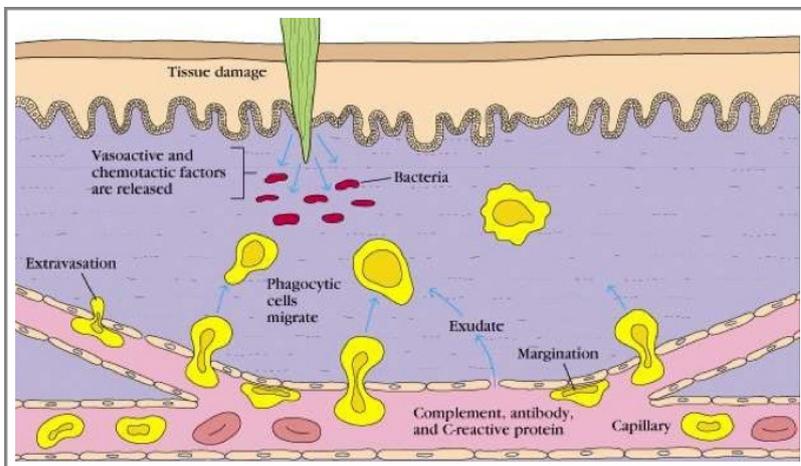
Natalizumab (Tysabri) è un inibitore selettivo delle molecole di adesione , un anticorpo

monoclonale antagonista della 4 integrina e viene impiegato nel trattamento per la Sclerosi Multipla , nel M. di Crohn e nell'Artrite Reumatoide .

L'accumulo dei leucociti nei tessuti rappresenta uno dei principali aspetti della risposta infiammatoria processo tipicamente scatenato da microbi , ma che può verificarsi anche in risposta a stimoli di tipo non infettivo . Una delle funzioni della risposta innata infatti è quella di innescare la risposta infiammatoria . Avviene in conseguenza di una ferita/danno o infezione , che comporta un trauma per tessuti e cellule che favorisce la presenza di sostanze estranee ed agenti infettivi come virus , batteri e funghi . La produzione di citochine richiama le cellule dei SI nel luogo di infezione , come leucociti e proteine plasmatiche (complemento e proteine fase acuta) .

I segni clinici dell'infiammazione sono Calor (calore dovuto all'innalzamento della temperatura corporea per via delle citochine infiammatorie prodotte) , Rubor (rossore dovuto come il calore alla vasodilatazione) , Tumor (gonfiore dovuto allo stravasamento dei liquidi) , Dolor (dolore dovuto alla stimolazione delle terminazioni nervose libere e in fine Functio lesa (perdita di funzione) .

Si individuano due tipi di infiammazione : Acuta o Angioflogosi , di breve durata , caratterizzata dalla comparsa di un essudato composto da liquidi , proteine plasmatiche (edema) e dalla migrazione (diapedesi) dei leucociti (soprattutto neutrofili) . Un secondo tipo di infiammazione è Cronica o Istoflogosi , di lunga durata , caratterizzata dalla presenza di linfociti/macrofagi , dalla proliferazione di vasi sanguigni , da fibrosi e necrosi tissutale .



L'infiammazione comporta le seguenti fasi :
1-Dilatazione dei vasi ; 2- Aumento del flusso di sangue ; 3- Aumento della permeabilità con conseguente fuoriuscita dei liquidi ; 4- Migrazione dei leucociti e diapedesi ; 5- Attivazione dei leucociti (fagocitosi) .

La funzione dell'infiammazione è quindi di Distruggere o confinare l'agente lesivo , Produrre una guarigione e Sostituire il tessuto danneggiato .

- Fagocitosi dei microrganismi

E' il meccanismo attraverso il quale i fagociti racchiudono i patogeni all'interno di vescicole o fagosomi , permettendo di attivare i meccanismi tossici di cui sono forniti ed eliminare così il patogeno .

La prima fase è il riconoscimento tramite il proprio recettore , che riconoscerà direttamente il microbo oppure sarà facilitato dall'opsonizzazione del microbo , quindi in base al recettore che avrà ,

questo riconoscerà direttamente o indirettamente il microbo . Infatti i fagociti esprimono il recettore Fc-gamma-RI tramite il quale riconoscono la porzione Fc delle IgG . L'opsonizzazione quindi promuove la fagocitosi in questo modo ; gli anticorpi sono prodotti dai linfociti B nella risposta adattativa , ma utilizzano i fagociti come strumenti per eliminare i patogeni .

L'uccisione del microbo avviene quindi nel fagosoma , il quale andrà fondendosi col lisosoma per formare il fagolisosoma. Vengono prodotte molecole microbicide all'interno di queste vescicole . I macrofagi al loro interno contengono degli enzimi proteolitici che uccidono i microbi , come l'elastasi o la catapsina G . Il macrofago che avrà fagocitato il microbo , avrà prodotto delle citochine che permettono di reclutare le cellule del sistema immunitario . Quei linfociti (T CD4+-Th1) che

Molecole effettrici	Funzioni
Proteine cationiche (catepsine)	Danneggiano la membrana dei batteri
Lisozima	Idrolizza i mucopeptidi della parete batterica
Lactoferrina	Priva i batteri del ferro
Enzimi idrolitici (proteasi)	Degradano i batteri

saranno stati attivati , avranno tra le loro funzioni effettrici , quella di produrre IFN-gamma , che andrà a stimolare i macrofagi ad intensificare l'attività microbicide , perchè li stimolerà a produrre intermedi reattivi dell'ossigeno , Ossido Nitrico e li indurrà ad accumulare enzimi lisosomali . Tutti questi elementi saranno fondamentali per l'eliminazione del microorganismo intracellulare . I macrofagi potranno produrre intermedi dell'ossigeno attraverso due vie ; una via è Ossigeno Indipendente (enzimi) e una via Ossigeno Dipendente . La via indipendente è costituita dagli enzimi lisosomali (immagine esempi principali) . Nella Via dipendente dall'ossigeno vediamo che questo processo è chiamato Burst Respiratorio e può essere mediato dall'enzima Mieloperossidasi (via mieloperossidasi-

Burst respiratorio
Via Ossigeno-dipendente
Reazioni Mieloperossidasi-indipendente

$\text{Glucosio} + \text{NADP}^+$		
$\xrightarrow{\text{G-6-P-deidrogenasi}}$	$+ \text{NADPH}$	
$\text{NADPH} + \text{O}_2$		$\text{NADP}^+ + \text{O}_2^-$
$\xrightarrow{\text{Cytochrome b558}}$		
$2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+$		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
$\xrightarrow{\text{Superossido dismutasi}}$		
$2 \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2$		$\text{OH}^- + \text{OH}^- + \text{O}_2$

dipendente) oppure no . L'evento finale è la produzione di intermedi dell'ossigeno che saranno altamente tossici per il microorganismo (ma anche per l'ospite) . Oltre agli intermedi dell'ossigeno , viene prodotto monossido di azoto **NO** , specie reattiva dell'azoto grazie all'enzima chiamato sintetasi inducibile del monossido di azoto (iNOS) . Anche questo processo è stimolato da IFN-gamma e TLR . Questo enzima catalizza la conversione di arginina a citrullina , con rilascio di monossido di azoto . All'interno dei fagolisosomi , questo

NO si combina col perossido di idrogeno per produrre il perossinitrito , altamente reattivo per uccidere i microbi . L'eccessiva attivazione dei macrofagi porta a danno tissutale . I macrofagi producono oltre a TNF-alfa e IL-1 , IL-12 che stimola NK e linfociti T attivati a produrre IFN-gamma (che stimola i macrofagi) .

- Cellule Natural Killer (NK)

Sono correlate ai linfociti e corrispondono al circa 5-20% delle cellule mononucleate nel sangue e nella milza . Uccidono direttamente la cellula infettata e sono anche una fonte importante di IFN-gamma . Non esprimono recettori riarrangiati , ma possiedono recettori derivanti dalla linea germinativa . L'attivazione delle NK è regolata dalla somma algebrica dei segnali che esso riceve .

Presenta sulla propria superficie contemporaneamente dei recettori attivatori e dei recettori inibitori e sarà la **somma** dei segnali che riceve a indurre la NK a svolgere una determinata azione . Le cellule nucleate esprimono normalmente , se sane , MHC I , in modo tale che possano certificare alla NK di essere self . Come meccanismi di difesa o di elusione del sistema immunitario , virus e cellule tumorali possono bloccare il processamento dell'MHC I in modo da inibire l'azione dei CTL , ma questo particolare non sfugge alle NK . Quando al NK non arriva il segnale richiesto , il recettore inibitorio che andrà a riconoscere proprio la MHC I non avrà il suo ligando (il virus inibisce l'espressione dell'MHC) e sarà capace di ucciderla . I recettori attivatori delle NK sono NKG2D e CD16 o Fc-gamma-III (recettore per la porzione Fc delle IgG di tipo III) . I recettori inibitori , che come detto legano le MHC I , risvegliano quindi le NK dal normale stato di inibizione e sono principalmente KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors - perché possiedono domini Ig) , CD94/NKG2 e ancora LIR (Leukocyte Ig-Like Receptors) .

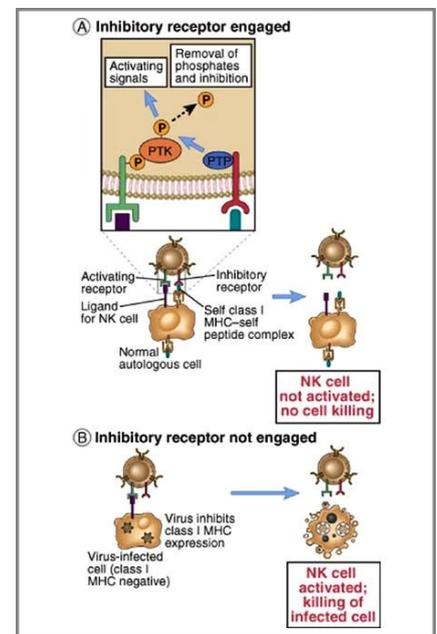
La proliferazione delle NK è stimolata dalle citochine IL-15 e IL-12 ; la 12 viene prodotta dai macrofagi stimolati da IFN-gamma ; vengono stimolati anche da IL-2 in alte concentrazioni .

Le NK uccidono le cellule bersaglio provocando lisi cellulare . All'interno delle NK sono presenti dei granuli contenenti perforina e granzimi che una volta esocitati possono svolgere il loro compito ; la perforina formerà dei buchi sulla membrana del microbo e il granzima può entrare per indurre la cascata apoptotica .

- Proteine solubili dell'immunità innata

Vengono definite il braccio umorale dell'immunità innata e sono il sistema del complemento , le pentrassine , le collettine e le ficoline .

Il sistema del complemento sono delle proteine solubili in grado di lisare la membrana microbica e vengono attivati tramite tre vie , due anticorpo dipendenti e una anticorpo indipendente ; queste tre vie portano all'attivazione di un complesso multienzimatico , formatosi dopo una cascata di subunità del complemento , in grado di produrre lisi cellulare . (vedi in dettaglio capitolo 14)

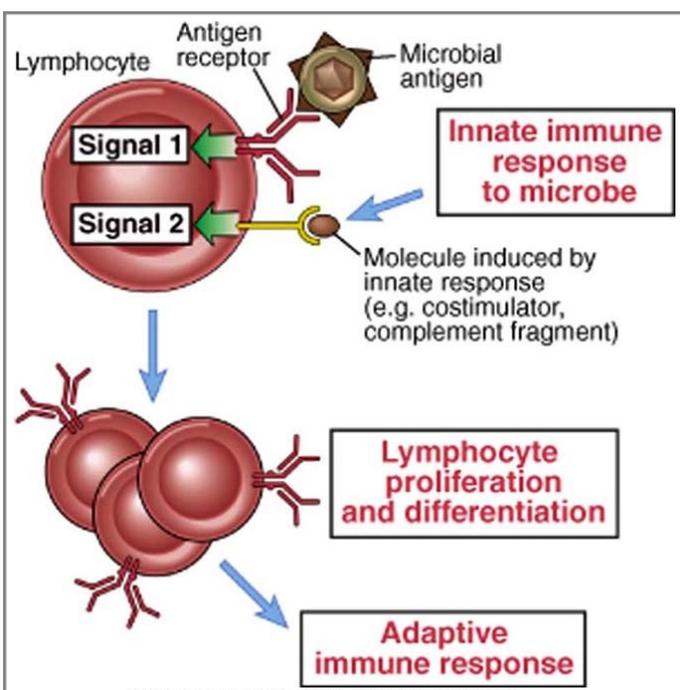


Le **pentrassine** sono un gruppo di proteine pentameriche delle quali fanno parte le pentrassine corte come la proteina C-reattiva (CRP) e la proteina siero amiloide P (SAP) e ancora la pentrassina lunga PTX3 . Le citochine IL-1 e IL-6 inducono la produzione da parte degli epatociti di SAP e CRP che sono chiamate nel loro insieme proteine della fase acuta , che si legano a molti funghi e batteri . CRP e SAP saranno in grado di attivare la via classica del complemento . Le **Collettine** sono una famiglia di proteine che hanno un dominio lectinico che lega i carboidrati e poi un dominio simil-collagene , per questo sono chiamate col-lectine . Di questa famiglia fanno parte tre proteine importanti : la lectina che lega il mannosio o MBL , che funziona da opsonina , va a legare i mannosidi ed è molto importante per attivare il complemento in una delle tre vie , la via della lectina ; ha una struttura omologa alla componente C1q del complemento . Le altre due proteine sono chiamate proteine surfattanti e sono la SP-A e SP-D , con proprietà lipofiliiche ai surfattanti nei polmoni ; fungono da opsonine , perché vanno a legare i microrganismi penetrati nelle vie aeree e ne favoriscono la fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari . Le **Ficoline** , sono strutturalmente simili alle collettine perché hanno il dominio simil-collagene , ma l'altro dominio non possiede lectine ed è simile al fibrinogeno . Queste opsonizzano batteri e attivano il complemento (via lectinica) . I loro ligandi sono la N-acetilglucosamina e l'acido lipoteicoico tipico dei batteri gram positivi .

- Citochine dell'immunità innata

Sono i principali mediatori della risposta innata e riconosciamo TNF-alfa , IL-1 , IL-6 , IL-12 , IFN-alfa e IFN-beta , chemochine , IL-10 , IL-23 , IL-15 , IL-17 , IL-18 e IL-27 .

Ruolo dell'immunità innata nell'attivazione dell'immunità specifica



L'immunità innata fornisce i segnali necessari per l'attivazione dell'immunità specifica , per la stimolazione della differenziazione dei linfociti B e T e della proliferazione . La risposta specifica viene innescata da due segnali contemporaneamente , e viene chiamata ipotesi del doppio segnale . Il primo segnale è fornito dal recettore del linfocito che interagisce col peptide presentato dall'APC ; il secondo segnale è rappresentato dalle molecole costimolatorie che le APC andranno a esporre sulla propria membrana e per le quali i linfociti avranno gli adeguati recettori . Se queste due situazioni non vengono soddisfatte , la risposta specifica non parte .

Capitolo 3

Cellule e Tessuti del sistema immunitario adattativo

Cellule del sistema immunitario adattativo

Sono classificabili in tre categorie : Linfociti , APC e cellule effettrici

- Linfociti :

Sono quelle cellule in grado di riconoscere e discriminare specificamente antigeni diversi . Sono esistenti diverse sottopopolazioni di linfociti , ma riconosciamo due classi principali , B e T .

Le B producono anticorpi e si chiamano così perché negli uccelli maturano nella Bursa di Fabrizio , organo non riscontrato negli esseri umani , mentre i linfociti T sono chiamati così perché compiono una maturazione diversa dai linfociti B , nel timo .

Le sottopopolazioni di linfociti B sono B-1 , B della zona marginale e B follicolari , mentre per i Linfociti T vediamo i linfociti T helper , i linfociti citotossici , i linfociti regolatori e i linfociti T gamma-delta .

I recettori dei linfociti T e B sono distribuiti clonalmente , cioè esistono molti cloni con specificità diverse e tutte le cellule dello stesso clone esprimono lo stesso recettore , grazie ad un processo chiamato ricombinazione somatica , un processo casuale . La ricombinazione somatica può portare grandi modificazioni alla specificità del recettore , ma per quanto riguarda gli T gamma-delta , B-1 e B della zona marginale , questa modificazione non apporta cambiamenti significativi .

Esistono poi le cellule NKT che condividono caratteristiche con i linfociti T ed esprimono anche marcatori per le NK ed esprimono il recettore diversificato .

Le proteine presenti sulle cellule possono essere utilizzate come dei marcatori fenotipici , chiamati generalmente CD , o Cluster of Differentiation , seguito da un numero .

I linfociti provengono dal midollo osseo da un progenitore comune , la cellula staminale , che poi perde progressivamente di pluripotenzialità . Una volta che i linfociti T e B sono maturi e pronti per

affrontare la realtà al di fuori degli organi di maturazione e pronti per incontrare gli antigeni , vengono chiamati linfociti naive (quindi maturi , ma vergini) .

Esistono ovviamente delle citochine fondamentali per dirigere maturazione , differenziazione , proliferazione dei linfociti sia B che T , come IL-7 necessario per la sopravvivenza dei linfociti T naive e BAFF necessario per le cellule B .

I linfociti T e B sono suddivisibili in effettori , dopo ulteriori differenziamenti (descritti altrove) e in cellule memoria , che saranno importanti per la risposta secondaria ad uno stesso antigene , quindi i linfociti sono responsabili di due caratteristiche fondamentali della risposta adattativa , della specificità e della memoria .

- APC : Sono le cellule che presentano l'antigene ; lo catturano nel sito di infezione e cominciano a migrare , cambiando da cellule che riconoscono l'antigene a cellule che presentano l'antigene (ai linfociti T) , dirigendosi verso gli organi linfoidi secondari , per innescare quindi la risposta specifica . Di questa categoria fanno parte le Cellule Dendritiche , i Macrofagi e gli stessi Linfociti B .

- Le cellule effettrici saranno le cellule differenziate , derivanti da linfociti B (plasmacellule che producono anticorpi , oppure cellule di memoria) o derivanti da linfociti T (vedi sottopolazioni capitolo 13)

Anatomia e Funzioni dei Tessuti Linfoidi

I tessuti linfoidi vengono classificati in organi linfoidi primari (midollo osseo per l'adulto , fegato fetale per il feto , Borsa di Fabrizio per gli uccelli e timo per i linfociti T nell'adulto) ed organi linfoidi secondari (linfonodi , milza e MALT) .

- Midollo osseo

E' la sede di produzione di tutte le cellule del sangue , compresi i linfociti immaturi ; inoltre è la sede di maturazione dei linfociti B .

Tutte le cellule del sangue derivano da un'unica cellula , la cellula staminale emopoietica , che come marcatore specifico esprimono CD34 e antigene-1 o SCA-1 . La differenziazione è stimolata da diverse citochine , in grado di indirizzare la maturazione verso vie differenti , ad esempio nel m.o. le citochine vengono prodotte dalle cellule stromali del midollo osseo e dai macrofagi , che formano così il microambiente , adatto per la maturazione ; inoltre il midollo osseo contiene le plasmacellule a lunga sopravvivenza

- Timo

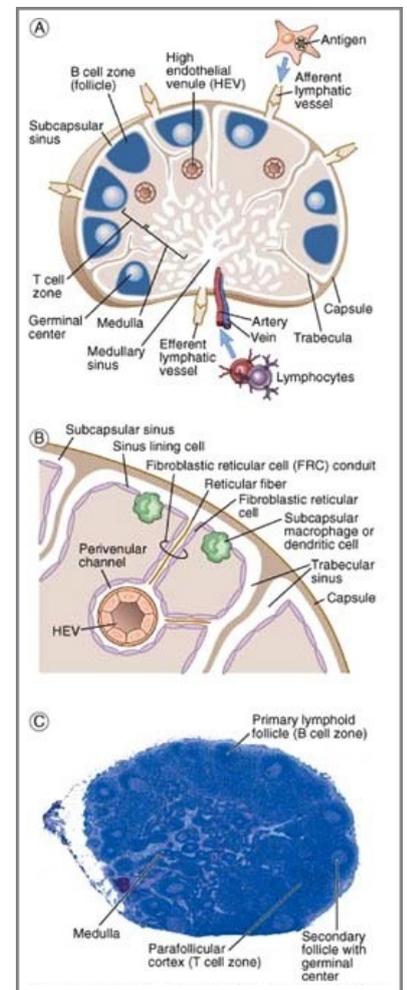
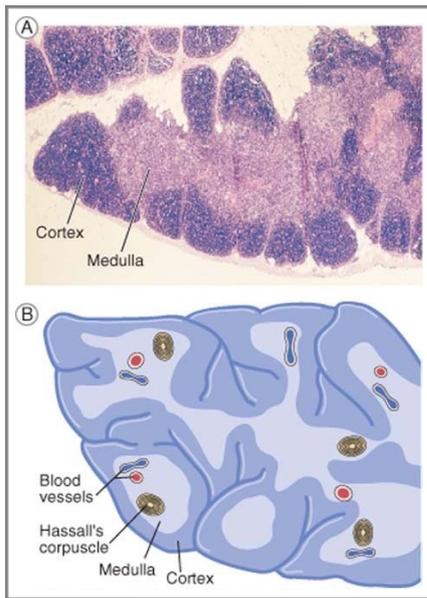
È la sede di maturazione dei linfociti T, un organo linfoepiteliale che deriva dalla III e IV tasca faringea. Ha una struttura a lobuli, ciascuno con una regione corticale ed una regione midollare.

La regione corticale è formata prevalentemente da cellule epitelio-reticolari e da timociti. La regione midollare invece è formata oltre che dai timociti, da macrofagi e cellule dendritiche; inoltre vediamo i corpuscoli di Hassall, residui di cellule in degenerazione. Il timo è riccamente vascolarizzato. Gli individui con la sindrome di DiGeorge hanno un deficit di cellule T dovuto ad una mutazione nei geni per lo sviluppo del timo. I progenitori linfoidi che si trovano nel midollo osseo migrano nel timo (timociti) dove completano la loro maturazione. Il timociti maturano nella corticale e nella

midollare del timo, per poi raggiungere gli organi linfatici periferici per riconoscere gli antigeni. Solamente il 5-10% dei linfociti entrati nel timo sopravviverà.

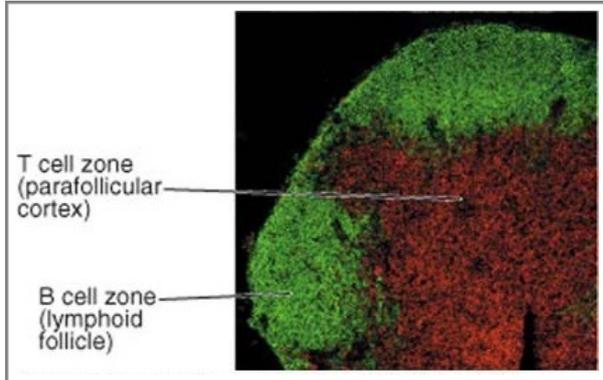
- Linfonodi e sistema linfatico. Gli antigeni catturati nei siti di infezione vengono portati nei linfonodi attraverso i vasi linfatici. Il fluido interstiziale assorbito d'ora in poi sarà chiamato linfa. La linfa viene portata attraverso una serie di stazioni dove questa viene testata, i linfonodi, progredendo per giungere in un dotto linfatico comune o dotto toracico, che farà confluire la linfa nuovamente nel torrente circolatorio attraverso la vena cava superiore.

Il linfonodo possiede un vaso afferente, poi una arteria, una vena ed un vaso linfatico efferente che costituiranno l'ilo. La linfa entra nel linfonodo attraverso un vaso linfatico afferente, che si dirige nel seno marginale, poi per il seno intermedio, per il seno midollare e poi esce dal linfonodo attraverso un vaso efferente, che a questo punto diventa il vaso afferente per il linfonodo successivo. Il linfonodo ha una struttura caratterizzata da più regioni. Vediamo intanto una capsula, poi principalmente vediamo una regione corticale più esterna ed una regione midollare più interna.



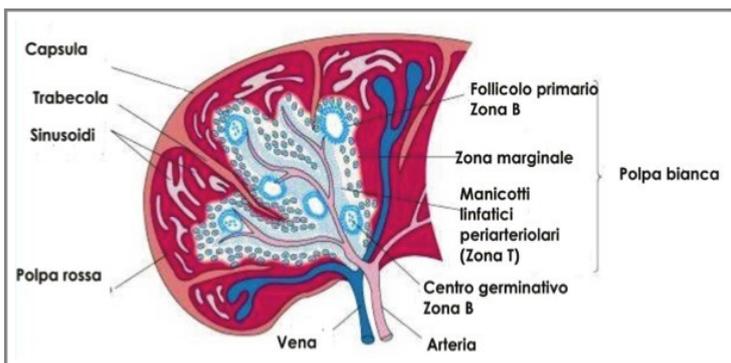
Nella corticale troviamo i follicoli , aggregati di cellule , i quali contengono a loro volta delle aree centrali , i centri germinativi (centri di un unico clone linfocitario) . Tra la corticale e la midollare troviamo un'area chiamata paracorticale o parafollicolare .

Queste tre aree sono popolate da cellule diverse , infatti nella regione corticale troviamo Linfociti B , nella regione paracorticale troviamo linfociti T e nella regione midollare troviamo plasmacellule . Questa distribuzione è molto importante , perché è resa tale dalle chemochine prodotte in queste sedi



. Le chemochine sono delle citochine che richiamano un determinato tipo cellulare , perché quel tipo cellulare possederà il recettore in grado di riconoscerle . Questo recettore viene condiviso da più tipi cellulari e sarà fondamentale nel processo di presentazione dell'antigene , in quanto andrà a garantire che l'antigene verrà portato in quelle aree dove ci sarà sicuramente la cellula in grado di riconoscerlo . Ad esempio le cellule T naive esprimono un recettore chiamato CCR7 che lega le chemochine CCL19 e

CCL21 , e queste sono responsabili della localizzazione dei linfociti T naive nelle aree parafollicolari ; le cellule dendritiche , che sono APC , possederanno lo stesso recettore per la stessa chemochina , quindi saranno richiamati qui e presenteranno l'antigene ai linfociti T naive . Lo stesso vale per i linfociti B naive , che esprimono il recettore CXCR5 per la chemochina CXCL13 prodotta nelle aree follicolari e anche le cellule follicolari dendritiche possederanno quel recettore . Quindi la segregazione anatomica ha un'importante correlazione funzionale .



- Milza

E' la principale sede in cui hanno inizio le risposte immunitarie nei confronti degli antigeni presenti nel sangue . Viene irrorata dall'arteria splenica , che penetra nell'ilo . Nel parenchima della milza si possono distinguere due aree principali , la polpa rossa (la maggior parte) e la polpa bianca . Le due aree svolgono funzioni distinte . La polpa bianca è

un organo linfopoietico , ricca di linfociti B e T ; la polpa rossa è un organo emocateretico , ricca di macrofagi e costituisce un luogo di distribuzione di cellule del sangue , principalmente eritrociti .

Le regioni della polpa bianca , ricche di linfociti , sono organizzate attorno ai rami dell'arteria splenica , o arterie centrali , per questo infatti sono chiamati manicotti linfoidi periarteriolarari (T) . Seguendo diramazioni sempre minori arriviamo a un seno vascolare chiamato seno marginale . All'esterno del seno marginale vi è una zona chiamata zona marginale , che delimita la polpa bianca , ricca di linfociti B e macrofagi .

Come nel linfonodo , anche nella milza le differenze strutturali sono associate alle differenze funzionali e le stesso chemochine saranno responsabili del popolamento di ciascuna delle aree .

- Sistema immunitario cutaneo

La cute contiene APC e linfociti e rappresenta la prima barriera del corpo . E' formata da una zona epiteliale o epidermide e una zona connettivale vascolarizzata o derma . Nell'epidermide troviamo principalmente cheratinociti , ma anche melanociti , cellule di Langerhans e linfociti T intraepiteliali . Le cellule di Langerhans formano una rete nella zona soprabasale dell'epidermide , dove andranno a riconoscere l'antigene e poi perdono di adesività per l'epidermide , stimolati dai TLR , e cominceranno la loro migrazione verso gli organi linfoidi secondari , esprimendo il CCR7 per dirigersi nelle aree T . Come detto maturano da cellule che riconoscono a cellule che presentano , o APC .

I linfociti Intraepiteliali sono circa il 2% dei linfociti associati alla cute e sono principalmente CD8+ . Esprimono il recettore T gamma-delta . Li troviamo anche nel rivestimento epiteliale dell'intestino . Il virus infetta la cellula epiteliale della mucosa intestinale , poi la cellula infettata espone il peptide virale al linfocita intraepiteliale CD8 attraverso MHC I ; il linfocita attivato uccide la cellula infettata per mezzo della perforina e del granzima o Fas attraverso apoptosi . Lo stesso accade per cellule stressate o danneggiate .

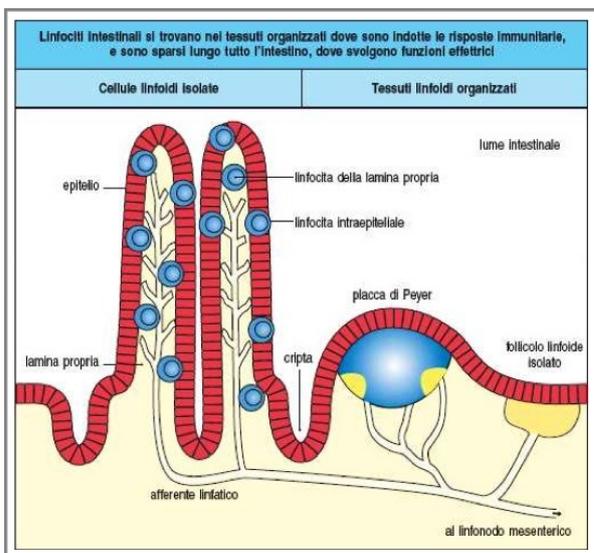
- Sistema Immunitario associato alle mucose o MALT

Appartengono a questa categoria la superficie mucosa del tratto gastrointestinale , respiratorio . Costituisce uno dei maggiori organi secondari . E' distribuito sulla superficie delle mucose coprendo un'area di circa 400 metri quadri . Il nome del tessuto del MALT cambia secondo il punto ove è

localizzato . Infatti chiamiamo GALT quando è associato all'intestino tenue (appendice ileo-cecale e placche di Peyer) , oppure BALT se associato alle mucose bronchiali o ancora NALT se associato alle mucose nasali . Il MALT ha tre livelli di organizzazione :

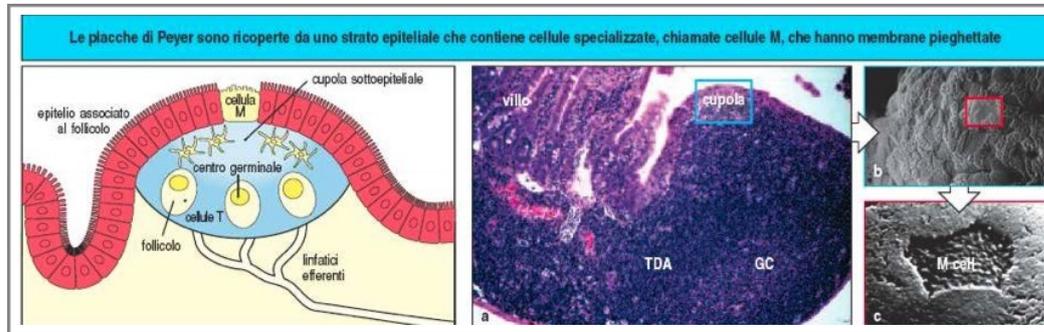
I follicoli linfatici organizzati come le tonsille , le placche di Peyer e l'appendice cecale . I follicoli linfatici isolati (presenti nella lamina propria dell'intestino) . Il tessuto linfatico diffuso (presente nella lamina propria dell'apparato digerente e respiratorio).

Nel GALT vediamo tre livelli di organizzazione : i linfociti intestinali si trovano nei tessuti organizzati dove sono



indotte le risposte immunitarie , e sono sparsi lungo tutto l'intestino , dove svolgono funzioni effettrici ; Cellule linfoidi isolate ; Tessuti linfoidi organizzati .

Le placche di Peyer sono un tessuto linfoide organizzato caratteristico , dove riconosciamo un'area centrale ricca di linfociti B e nelle regioni interfollicolari troviamo anche CD4+ , ma la maggioranza netta 70% sono B . Le cellule epiteliali che circondano le placche sono particolari , delle cellule



specializzate chiamate cellule M o membranose . Queste cellule presentano una superficie luminale con attività picnotica ed hanno il compito di trasportare per transitosi dal lume fino alla parte opposta le

macromolecole . Dalla parte opposta possiamo trovare le placche di Peyer che quindi potranno recuperare in questo modo antigeni . Anche l'appendice cecale e le tonsille faringee hanno una struttura simile alle placche di Peyer .

Vie e Meccanismo della ricircolazione e homing linfocitario

I linfociti naive passano in continuazione dal sangue ai linfonodi per poi ritornare in circolo attraverso i vasi linfatici , per incontrare prima o poi l'antigene per cui sono specializzati . Questo processo è chiamato **Ricircolazione linfocitaria** , che rende massima la possibilità di quei linfociti specifici per quell'antigene , che sono normalmente pochi , di trovare l'antigene corretto .

Come abbiamo visto poi ci sono anche dei distretti in cui sono preferenzialmente presenti dei linfociti piuttosto che altri ed è dovuto alle chemochine prodotte in quelle sedi , in un processo chiamato **Homing** linfocitario .

Le molecole di adesione presenti sui linfociti vengono chiamati recettori di homing , mentre le molecole espresse per l'homing dagli endoteli sono chiamate addressine .

- L'homing dei linfociti T naive ai linfonodi e ai tessuti linfoidi avviene a livello delle venule post capillari specializzate ad altro endotelio o **HEV** . Come già discusso il processo è mediato da selectine espresse in risposta alle citochine prodotte dai macrofagi , la L-Selectina , mentre sull'endotelio viene espressa l'addressina specifica o PNAd (nelle placche di Peyer il ligando è MadCAM-1) . La fase successiva è l'adesione ferma , mediata dalle integrine , da LFA-1 e VLA-4 di cui l'affinità viene aumentata dalle chemochine CCL19 e CCL21 che legano CCR7 . Questa interazione aumenta l'avidità di legame all'endotelio e al punto di massima concentrazione di segnali

chemiotattici avviene la diapedesi , mediata da CD31 espressa dalle cellule endoteliali . I linfociti naive che non riconoscono l'antigene sono riportati in circolo , perché quelli che lo riconoscono vengono trattenuti in questa sede da altre molecole di adesione . I naive che non hanno riconosciuto ritornano in circolo e questo dipende da un chemoattrante lipidico chiamato sfingosina-1-fosfato o S1P che normalmente ha una concentrazione più alta nel circolo che nei tessuti ; quando deve uscire questa si lega a S1P1 che stimolano la migrazione dei linfociti lungo la concentrazione di S1P che è più alta al di fuori dei tessuti , quindi migrano al di fuori . I linfociti T naive circolanti esprimono bassi livelli , perché c'è abbondanza nei tessuti e quando entrano nel linfonodo , devono riesprimerlo perché l'alta concentrazione nel circolo ha causato l'internalizzazione del recettore . Per legare l'S1P devono esprimere il recettore quindi , ma per farlo impiegano tanto tempo , quel tempo necessario alle cellule per riconoscere l'antigene , e una volta riespresso , legano S1P ed escono .

- Migrazione dei linfociti T **effettori** ai siti di infiammazione . I linfociti effettori si trovano nei siti dove è necessaria la loro presenza per eliminare i microbi e ciò è regolato dall'espressione dei recettori per chemochine e S1P . L'adesione è sempre la stessa come meccanismo . Durante la maturazione le cellule acquisiscono una capacità migratoria selettiva ; le cellule effettrici verso la cute esprimeranno CLA-1 che lega la E-Selectina e i recettori CCR4 e CCR10 che legano CCL17 e CCL27 nella cute infiammata ; nell'intestino esprimono l'integrina alfa4-beta7 che lega MadCAM-1 e il recettore CCR9 per CCL25 .

- Migrazione dei linfociti T di memoria . Questi sono distinti in centrali (CD45RO) che esprimono CCR7 e L-Selectina e poi in effettrici di memoria che non esprimono queste due proteine , ma rispondono velocemente alla stimolazione antigenica , per rispondere efficacemente .

- Migrazione dei linfociti B . Come detto esprimono CXCR5 che lega CXCL13 espressa nelle aree B

Capitolo 4

Anticorpi Antigeni

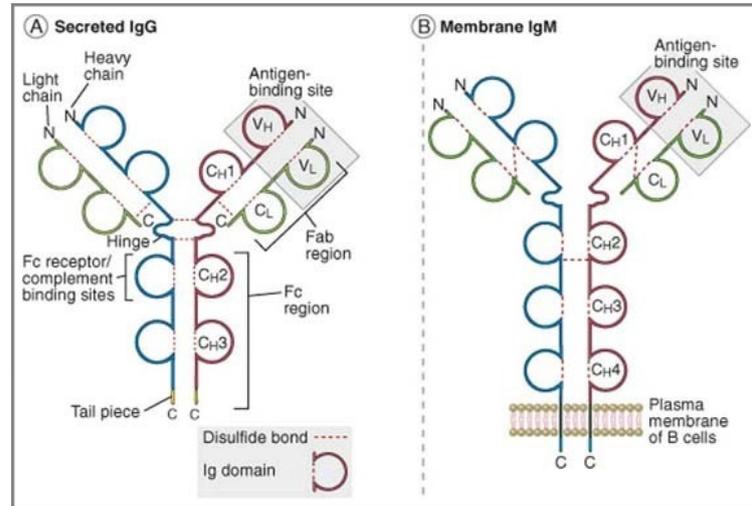
Gli **anticorpi** sono proteine circolanti , prodotte dai vertebrati in seguito all'esposizione ad agenti estranei , o antigeni . Un **antigene** è una sostanza che può legarsi in modo specifico ad un anticorpo o al recettore dei linfociti T .

Gli anticorpi esistono in due forme : sono secreti , se in circolo , nei tessuti , nelle mucose ; sono legati sulla membrana dei Linfociti B dove funzionano come recettori per l'antigene .

Distribuzione e Produzione di anticorpi

I Linfociti B sono le cellule che producono gli anticorpi e questi vanno in circolo . Quando si forma un coagulo , gli anticorpi restano nella fase fluida chiamata siero ; se all'interno del siero si trovano anticorpi specifici contro un determinato antigene , viene chiamato antisiero .

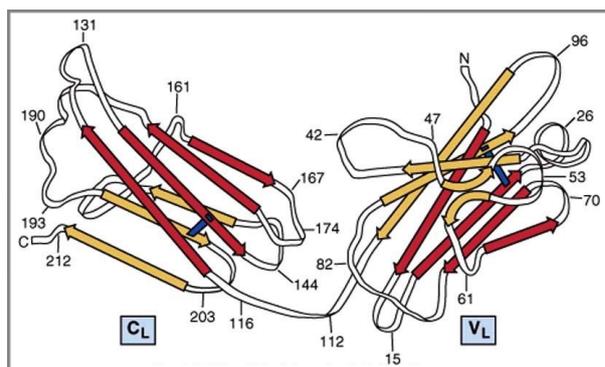
Un individuo sano di 70 Kg produce 2-3 grammi di anticorpi al giorno (il 60% delle quali sono IgA , ma in circolo non ne troveremo una grandissima quantità perché svolgono le loro funzioni nelle mucose) .



Struttura molecolare degli anticorpi

Glicoproteine plasmatiche o sieriche , vengono classificate , in base alla loro solubilità , in albumine e globuline e possono essere ulteriormente distinte in base alla capacità di migrare in un campo elettrico , durante un'elettroforesi . A seconda delle diverse velocità di migrazione le globuline si separano in gruppi e il terzo gruppo appartiene alle gammaglobuline , ovvero gli anticorpi , o anche **Immunoglobuline** .

Tutti gli anticorpi condividono una struttura di base , ma mostrano notevole variabilità nelle regioni che vanno a legare l'antigene , il che dimostra la variabilità che hanno gli anticorpi per riconoscere un numero di antigeni diversi . Ogni individuo può produrre più di 10^9 anticorpi differenti .



Una molecola anticorpale ha una struttura simmetrica composta da due catene leggere e da due catene pesanti . Sia le catene leggere che le catene pesanti contengono una serie di unità omologhe ripetute di circa 110 aminoacidi , che si ripiegano a formare una struttura globulare definita **dominio Ig** . Un domini Ig è formato da due foglietti

Beta-planare (o Beta-barile) , ciascuno dei quali composto da tre-cinque nastri polipeptidici ad andamento antiparallelo . I due foglietti sono tenuti insieme da un ponte disolfuro e i nastri adiacenti a ogni foglietto Beta sono connessi da brevi anse . Molte importanti proteine del sistema immunitario contengono domini Ig e per questo si dice che facciano parte della **superfamiglia delle Ig** .

Sia le catene pesanti che le catene leggere possiedono dei domini Variabili (N-Terminali) che associandosi partecipano al riconoscimento dell'antigene e Costanti (C-Terminali) che invece sono responsabili delle funzioni effettrici degli anticorpi .

La catena pesante è composta da un dominio Ig variabile e da tre o quattro domini Ig costanti , mentre ciascuna catena leggera è formata da una regione V e una regione C .

Le regioni V sono chiamate variabili perché saranno le regioni responsabili della grande variabilità anticorpale e variabilità di specificità antigenica . La regione V di una catena pesante , va ad associarsi con la regione V della catena leggera , per formare **il sito dei legame per l'antigene** . Poiché ciascun anticorpo è formato da due catene pesanti e due catene leggere , allora ogni anticorpo avrà due siti di legame per l'antigene .

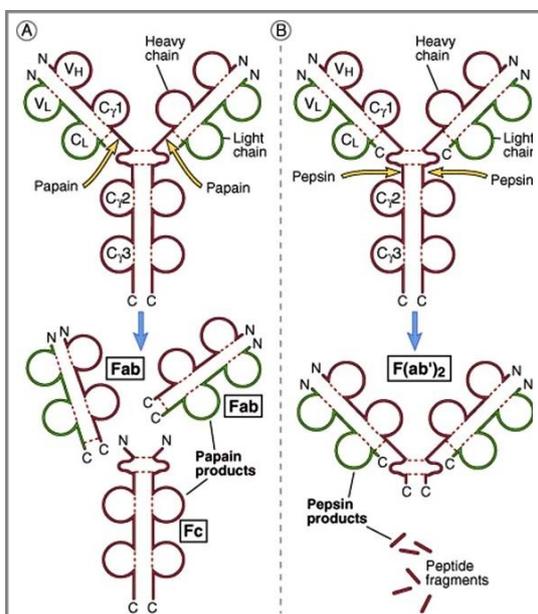
Le regioni C della catena pesante , che potranno essere 4 (M,E) o 3 (G,A,D) invece andranno ad interagire con cellule effettrici o molecole del sistema immunitario e sono responsabili della maggior parte delle funzioni biologiche svolte dagli anticorpi . L' estremità carbossi-terminale della catena pesante andrà ad ancorare l'anticorpo alla membrana plasmatica , mentre la catena leggera non ancora , né partecipa delle funzioni effettrici .

Ogni catena leggera ha un peso molecolare 24 kD , mentre ogni catena pesante pesa 55-70 kD . Le catene leggere e pesanti sono legate covalentemente con ponti disolfuro , che si vengono a formare tra i residui di cisteina della parte carbossi-termilane della catena leggera e il dominio C1 della catena pesante . Inoltre contribuiscono alla stabilità dell'anticorpo le interazioni tra le regioni

variabili delle catene pesanti e leggere e anche tra le regioni costanti . Un terzo legame è rappresentato da ponti disolfuro che legano le catene pesanti tra di loro .

Nelle IgG i ponti disolfuro sono tra i residui di cisteina delle C2 pesanti , vicino alla regione chiamata cerniera .

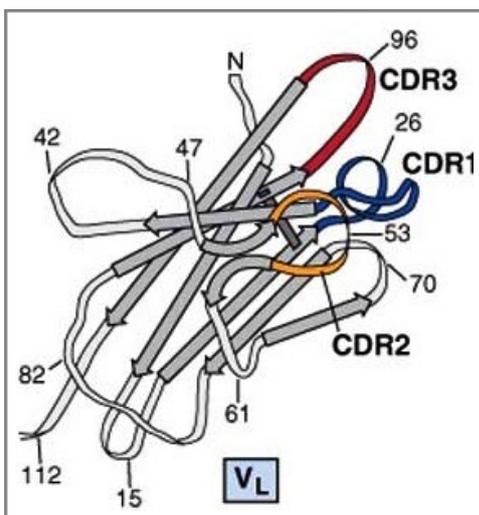
Nelle IgG la regione cerniera tra i domini C1 e C2 pesanti costituiscono la regione più sensibile all'azione di enzimi proteolitici . Quando le IgG di coniglio vengono trattate con l'enzima papaina in condizioni di proteolisi limitata , l'enzima agisce a livello della regione cerniera e taglia le IgG in tre pezzi separati ; due di questi pezzi sono identici tra loro e



costituiscono il frammento **Fab** , o frammento che lega l'antigene , e sono costituiti dalle catene leggere intere associate al frammento V-C1 pesante e mantengono quindi la capacità di legare l'antigene .

Il terzo pezzo invece è costituito da due polipeptidici identici legati da ponti disolfuro , contenenti i domini C2 e C3 pesanti ; questi frammenti tendono ad aggregarsi tra di loro e a cristallizzare formando un reticolo , quindi vengono chiamati **Fc** o frammento cristallizzabile .

Quando invece si usa la pepsina , in condizioni di proteolisi limitata , la proteolisi avviene in un punto distale rispetto alla regione cerniera , dando origine ad un frammento $F(ab')_2$, che lega l'antigene e mantiene intatti la regione cerniera e i ponti disolfuro tra le catene .

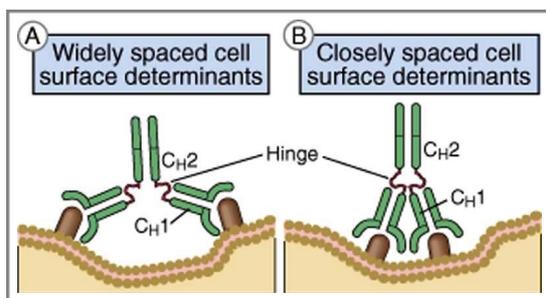


Le differenze maggiori tra gli anticorpi si concentrano nelle regioni variabili delle catene pesanti e leggere . All'interno delle regioni variabili si trovano delle tre sottoregioni chiamate regioni **ipervariabili** e corrispondono alle tre anse che fuoriescono dalla struttura e che connettono i nastri adiacenti dei foglietti Beta che costituiscono i domini V delle catene pesanti e leggere delle Ig . Queste regioni ipervariabili hanno una lunghezza di circa 10 aminoacidi e sono tenute assieme dall'intelaiatura formata dal dominio Ig della regione V . In un anticorpo le tre regioni ipervariabili formano una struttura tridimensionale che costituisce il sito di legame per l'antigene . Poiché queste sequenze andranno a

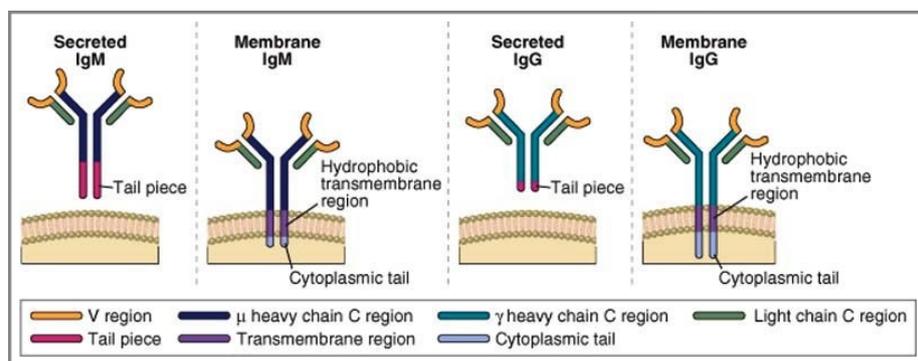
formare una superficie che è complementare alla struttura dell'antigene , sono chiamate regioni che determinano la complementarità o CDR e sono chiamate CDR1 , CDR2 e CDR3 che formano anse esposte sull'anticorpo che sono disponibili per interagire con l'antigene ; in questo modo gli anticorpi condividono una struttura di base comune ma allo stesso tempo sono molto diversi tra loro grazie a queste regioni di complementarità . I residui delle regioni ipervariabili formano contatti multipli con l'antigene e il contatto più esteso è quello che avviene a livello della terza regione , CDR3 , quella col maggior grado di variabilità .

Gli anticorpi sono divisi in cinque classi IgA , IgD , IgE , IgG e IgM , inoltre esistono delle sottoclassi per IgA1 e IgA2 più IgG1 , IgG2 , IgG3 e IgG4 .

Le catene pesanti sono indicate come alfa , delta , epsilon , gamma e μ e i corrispondenti numeri delle sottoclassi ; le catene leggere invece sono distinte in due isotipi , kappa e lambda . Ogni isotipo di Ig presenta un tipo di catena leggera e un tipo di catena pesante ; nell' uomo il 60% sono kappa e il 40% lambda e variazioni di questo rapporto viene spesso utilizzato come ausilio di diagnosi per i linfomi a cellule B , perché cloni neoplastici producono anticorpi con la stessa catena leggera .



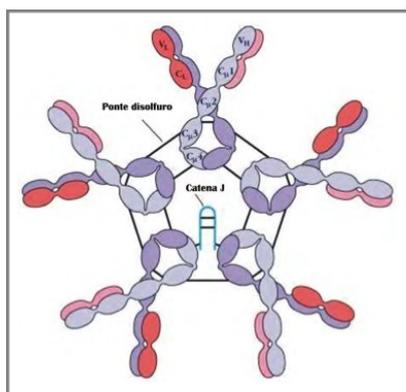
Gli anticorpi sono molecole flessibili in grado di legarsi a diversi tipi di antigeni e possono orientare i siti in modo che i due antigeni siano poste su una superficie piana, perché la regione cerniera è molto flessibile, nei domini C1 e C2 pesanti (questa regione ha dimensioni comprese tra 10-60 aminoacidi) e le porzioni di queste sequenze assumono una conformazione flessibile che permette una torsione tra C1 e C2.



Gli anticorpi possono essere espressi in forma secreta o in forma di membrana, in base alla sequenza aminoacidica C-terminale all'ultimo dominio C della catena pesante. La forma di membrana include una regione transmembrana idrofobica ad

alfa elica nella parte carbossi-terminale, seguita da una regione intracellulare caricata positivamente che ancora la proteina alla membrana (IgM e IgD sono tre residui solamente, mentre per IgE e IgG sono 30). Le forme secrete di IgA e IgM contengono un polipeptide addizionale di 15 kD chiamato Catena J (joining), legato da ponti disolfuro alla sequenza coda, deputato a stabilizzare il complesso multimerico e a trasportare i multimeri attraverso gli epitelii dalla parte basolaterale a quella luminale.

Classi di Anticorpi :

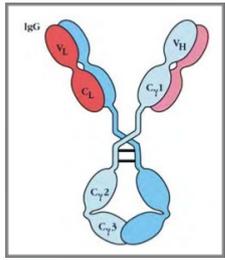


IgM : nel siero è una molecola pentamerica di 900 kD, tenuta insieme da ponti disolfuro e dalla catena J; sono il 10% delle Ig totali. Hanno 5 giorni di emivita e una concentrazione nel sangue di 0,5-2 mg/ml.

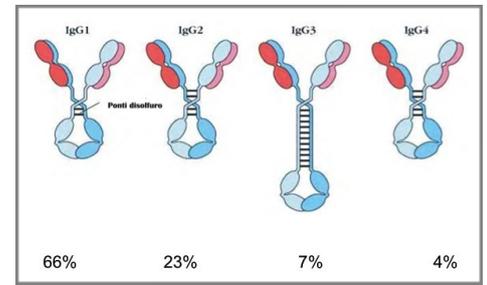
È la prima Ig prodotta durante una risposta immunitaria primaria, infatti elevati livelli di IgM indicano una recente esposizione ad un antigene. È la prima Ig prodotta nel feto e elevate concentrazioni di IgM alla nascita sono segno di una infezione intrauterina. L'IgM

monomericamente si trova sulla membrana dei Linfociti B associati alle IgD per formare il BCR. È agglutinante, è capace di attivare il complemento attraverso la via classica ed è molto efficiente come prima linea di difesa contro le infezioni batteriche, mentre è poco efficiente nel neutralizzare tossine e virus.

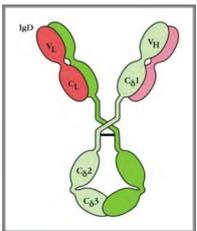
IgG : monomero di 150 kD con distribuzione intra ed extra-cellulare; sono il 70-75% delle Ig totali e ne esistono 4 di sottoclassi, in diverse concentrazioni; è un anticorpo agglutinante e opsonizzante



e attiva la via classica del complemento . Questo è l'unico anticorpo che attraversa la placenta (poco IgG4) e quindi conferisce immunità al feto e al neonato ; passa tramite il recettore **FcRn** (Recettore neonatale per Fc , omologo delle MHC



I) . Questo sarà un recettore che viene espresso per attraversare la placenta e nell'adulto rimane invece a livello dell'endotelio , dell'intestino e del fegato . Questo recettore avrà un'importanza vitale perché capterà dal lume apicale le IgG e le porterà nel lume baso-laterale dove ci sarà un pH notevolmente più basico 6 a 7,4 . Questo continuo ciclo di internalizzazione e rilascio permette alle IgG di avere una emivita nettamente superiore rispetto alle altre Ig , infatti è di 23 giorni e una concentrazione di 8-16 mg/ml , il 70% delle totali . Questo fatto viene sfruttato dagli anticorpi monoclonali che possono essere proteine di fusione del frammento Fc delle IgG con un'altra proteina . Viene indotto infine lo switch IgG dall'IFN-gamma . Neutralizza efficacemente virus e tossine batteriche e media la reazione di citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC) da cellule NK e macrofagi .

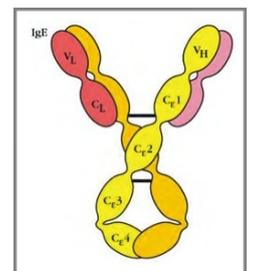


IgD : monomero di 180 kD , presente quasi esclusivamente sulla superficie dei linfociti B naive , dove costituisce insieme alle IgM il recettore per l'antigene BCR . Nel siero è presente in meno dell'1% delle Ig totali . E' molto suscettibile a degradazione . Ha un ruolo nell'attivazione dei linfociti e nel differenziamento di questi . Concentrazione

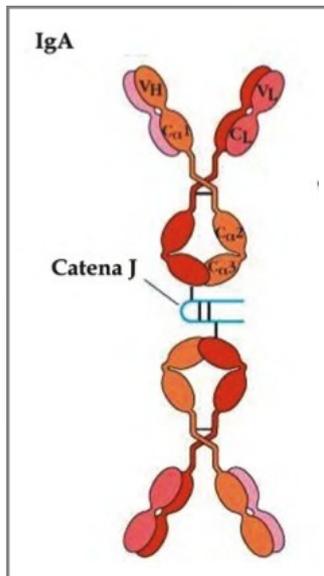
bassissima pari a 0,04 mg/ml .

IgE : monomero di 200 kD , con quattro domini C pesanti . E' attivo nella difesa contro alcuni parassiti . Nel siero è presente in bassissime concentrazioni (3×10^{-4} mg/ml) . La maggioranza si trova su basofili e mastociti .

Concentrazioni bassissime (tracce) . Importanti per mediare le reazioni di ipersensibilità immediata e risposte verso i parassiti perché la loro porzione Fc è riconosciuta da mastociti , eosinofili e basofili , promuovendone l'attivazione .



IgA : Nel siero sono monomeriche (15-20%) con peso di 160 kD . Presenti come Dimeri nelle secrezioni (saliva , lacrime , muco e latte materno) e sono tenuti insieme dalla catena J con peso di 400 kD . Vengono prodotte dalle plasmacellule presenti nel MALT insieme alla catena J . Sono necessarie nella difesa contro le infezioni a livello della mucosa respiratoria ed intestinale . Hanno un'efficiente attività antivirale in quanto prevengono il legame dei virus alle cellule epiteliali . Le cellule che producono le IgA si trovano nella tonaca mucosa, proprio al di sotto dell'epitelio. Una volta secrete nell'ambiente extracellulare, le IgA dimeriche si legano ad uno speciale recettore per la loro porzione Fc presente sulla superficie interna delle cellule epiteliali, chiamato recettore poli-Ig (perché



presenta nella sua struttura cinque domini Ig). Questo recettore legato alla IgA viene quindi internalizzato per endocitosi nella cellula epiteliale della mucosa, e viaggia in una vescicola endocitotica fino al versante luminale della cellula dove subirà un taglio proteolitico che stacca la porzione idrofobica dal recettore : a questo punto, la vescicola si fonde con la membrana e la porzione del recettore poli-Ig contenente i cinque domini Ig viene secreta nel lume assieme alla IgA, prendendo così il nome di "componente secretoria". Il recettore poli-Ig anche chiamato frammento SC (componente secretoria) ha anche un ruolo nella secrezione luminale delle IgM, sebbene più marginale. Le IgA secrete nel lume vanno a mischiarsi nel muco prodotto dalle cellule epiteliali e costituiscono una prima barriera difensiva contro i microbi, ai quali si vanno a legare non appena entrano a

contatto con la parete del lume digerente o respiratorio. Esiste in due forme IgA1 e IgA2 .

Nonostante livelli significativi di IgA nel siero umano , è la forma secretoria la più importante in senso funzionale e viene espressa in forma monomerica ; nel siero sono il 90% IgA1 , mentre nelle secrezioni le IgA2 sono il 75-90% e prevalgono anche nel colon [IgA2 (60%)] . Le IgA assieme alle IgG saranno la prima protezione fornita al neonato dalla madre , infatti queste potranno essere passate tramite l'assorbimento intestinale in circolo (IgG attraversano anche la placenta) .

Legame degli anticorpi agli antigeni

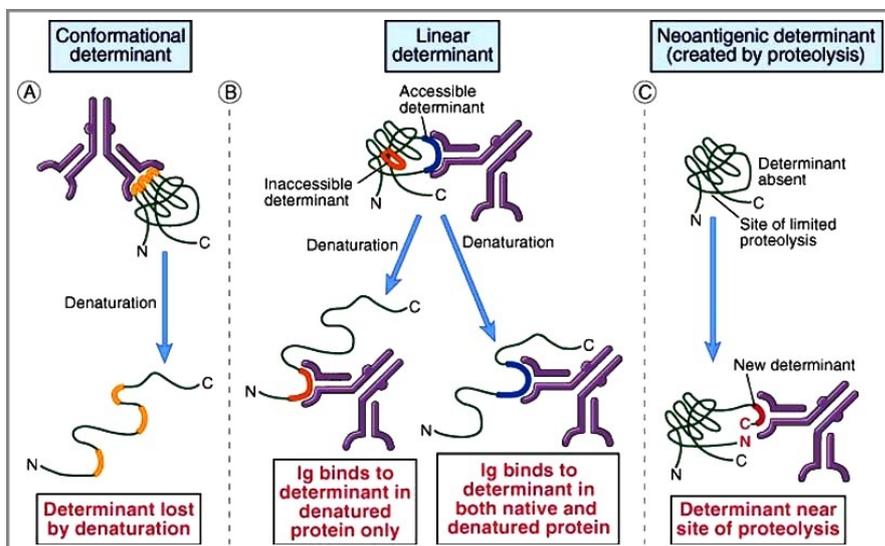
Un **antigene** è una sostanza che può legarsi in modo specifico ad un anticorpo o a un recettore di un Linfocito T dove gli anticorpi possono riconoscere praticamente ogni tipo di molecola , a differenza delle cellule T che riconoscono solo peptidi . Anche se tutti gli antigeni sono riconosciuti da linfociti o anticorpi specifici , solo alcuni riusciranno ad attivare i linfociti . Quelle molecole che riescono ad attivare i linfociti vengono dette **immunogene** . Solo le macromolecole sono in grado di iniziare una risposta umorale , perché l'attivazione delle cellule B richiede che ci sia un aggregazione di più recettori e di più antigeni , quindi composti di piccole dimensioni non possiedono queste caratteristiche , come il dinitrofenolo che può legarsi agli anticorpi ma non può attivare le cellule B a meno che non si leghi ad un'altra molecola o macromolecola , che ne aumenti così l'immunogenicità . La piccola molecola viene definita **aptene** , mentre la macromolecola viene definita **carrier** . Il complesso aptene-carrier è così dotato di immunogenicità . Un altro modo per diventare immunogeno è quello di farlo diventare mutilavate ; un antigene che possiede più determinanti identici nello stesso antigene viene detto **multivalente** o polivalente . Gli anticorpi si legano non a tutta la molecola (perché è in generale di dimensioni più grosse) , ma solamente a porzioni distinte , all'**epitopo** o determinante .

Un antigene per essere considerato tale deve possedere tre caratteristiche : 1) Estraneità , quindi deve essere estranea all'organismo o deve essere considerata estranea ; 2) Antigenicità , quindi deve legarsi all'anticorpo o al recettore TCR e infine deve possedere 3) Immunogenicità , deve indurre una risposta immunitaria adattativa . L'aptene è dotato quindi di estraneità e antigenicità , ma manca di immunogenicità e per diventare immunogena deve legarsi al carrier . L'immunogenicità è influenzata da molti fattori , come la Natura chimica dell'antigene ; i carboidrati , lipidi e acidi nucleici (tutti e due immunogeni solo se legati a proteine o carboidrati) sono in grado di attivare la risposta anticorpale , mentre le proteine che sono dei potenti immunogeni attivano la risposta umorale o cellulo mediata ; un altro fattore che influenza è la Complessità della struttura chimica , quindi più epitopi danno maggiore immunogenicità ; il Peso molecolare , peso maggiore , più immunogenicità ; Dose e via di penetrazione ; Degradabilità da parte di enzimi macrofagici ; il Corredo genetico , infatti alcuni individui sono più sensibili a determinati antigeni ; l'uso di Adiuvanti , che vengono usati nei vaccini per rilasciare lentamente l'antigene e aumentare la risposta immunitaria o innescare meglio la risposta cellulo-mediata .

Gli antigeni batterici principali sono: LPS , acido tecoico , peptidoglicano e tossine ; gli antigeni virali : il rivestimento lipoproteico ; antigeni fungini : polisaccaridi capsulari , glicoproteine o polisaccaridi prodotti dal fungo .

Esiste una classe di antigeni chiamata *Superantigeni* che stimola i linfociti T a dare un'intensa risposta primaria , simile a quella attivata dalle molecole MHC ; questi vengono prodotti da molti microrganismi , tipo batteri , micoplasmi e virus . Sono riconosciuti dai linfociti T senza essere processati in peptidi che si legano ad MHC (la frammentazione dei superantigeni ne elimina l'attività biologica) ; l'attività biologica infatti dipende dal legame della proteina intera alla superficie esterna delle molecole MHC II che hanno già legato un peptide . I Superantigeni sono in grado di stabilire legami con numerosi recettori dei linfociti T e una volta legati ai CD4 viene attivata una grande produzione di citochine che provocano una tossicità sistemica e la soppressione della risposta

immunitaria adattativa .



Gli epitopi possono essere differenti , infatti la disposizione spaziale di questi può influenzare diversamente gli anticorpi . Esistono epitopi sovrapposti e epitopi non sovrapposti .

Quando i determinanti sono ben separati e due o più anticorpi per interagirci non si influenzano a vicenda si parla di epitopi non sovrapposti ; quando invece i due determinanti sono

vicini , di modo che gli anticorpi si ostacolano , allora si parla di epitopi sovrapposti , infatti il legame del primo anticorpo può causare un cambiamento conformazionale nella struttura dell'antigene , in modo da alterare il legame del secondo attraverso un fenomeno chiamato *effetto allosterico* .

Gli epitopi inoltre possono essere distinti in lineari e conformazionali . Gli **epitopi lineari** sono formati da sequenze lineari di residui aminoacidici ; questi epitopi sono accessibili agli anticorpi se sono esposti sulla superficie esterna dell'antigene o in una regione che si estende al di fuori della proteina ripiegata , infatti nella struttura ripiegata potrebbero esserci epitopi inaccessibili , che diventano accessibili solamente quando questa viene denaturata e la denaturazione non interessa ovviamente l'epitopo . Gli epitopi sono **conformazionali** , quando sono costituiti da residui aminoacidici non disposti in sequenza e si formano solamente con la giustapposizione spaziale dovuta al ripiegamento della proteina ; modificazioni come fosforilazione , glicosilazione e proteolisi , modificano irrimediabilmente l'epitopo conformazionale . Esiste inoltre un'altra categoria di epitopi , detti neo-antigenici , perché alterazioni della struttura possono produrre nuovi epitopi che vengono poi riconosciuti dall'anticorpo .

- Legame antigene anticorpo

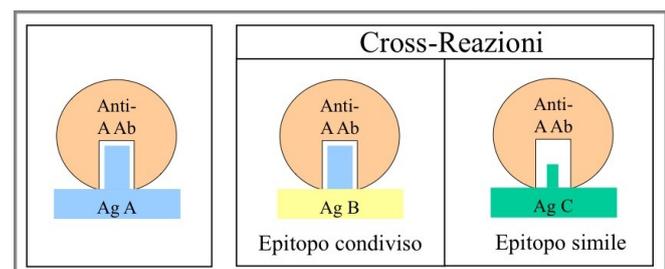
Gli anticorpi legano l'antigene grazie alle regioni variabili pesanti e leggere e nella maggior parte dei casi il sito di legame è una superficie planare che può alloggiare gli epitopi . Il legame è di tipo non covalente e reversibile , ci sono numerose interazioni contemporanee come interazioni idrofobiche , forze di van der Waals , forze elettrostatiche e legami a idrogeno . La forza del singolo legame tra Ab e Ag è detta **affinità** , mentre la somma totale tra Ab e Ag è detta **avidità** . L'affinità viene espressa solamente come costante di dissociazione K_d che indica la facilità di rottura del legame , quindi una bassa costante significa che è necessaria una concentrazione minore di antigene e di anticorpo per formare il legame . Quelle Ig come IgM che possiedono una struttura più complessa , possono legare più epitopi e infatti ogni IgM può legare fino a 10 antigeni quindi avranno un'avidità maggiore rispetto alle altre Ig .

Rapporto tra struttura e funzione nelle molecole anticorpali

- Specificità

Gli anticorpi sono estremamente specifici per l'antigene che riconoscono e sono in grado di discriminare minime differenze nella loro struttura chimica , possono discriminare anche per un residuo aminoacidico .

Alcuni anticorpi però possono legarsi a due antigeni differenti , strutturalmente correlati nel fenomeno chiamato cross-reattività .



- Diversificazione

Un individuo è capace di generare un numero enorme di anticorpi differenti , circa 10^9 , o diversificazione . Il numero complessivo di anticorpi con differenti specificità viene detto **repertorio anticorpale** .

- Maturazione dell'affinità

La capacità degli anticorpi dipende dalla potenza di legame ; gli anticorpi riconoscono antigeni con alta o bassa avidità . Questa avidità nel corso della risposta può aumentare mediante piccole modificazioni che avvengono nelle regioni V , nella maturazione dell'affinità , in un aumento dell'affinità media degli anticorpi . I linfociti grazie a questo meccanismo riescono ad avere una specificità per l'antigene migliore .

- Switching Isotipico

Le cellule B possiedono un recettore BCR che è composto da IgD e IgM e quando sono attivate possono andare incontro a switching , in cui varia la regione costante , ma rimane invariata la regione specifica del sito di legame per l'antigene . Grazie a questo fenomeno si cambia la classe dell'anticorpo , mantenendo costante la specificità ; è un fenomeno di adattamento della risposta umorale , perché cambiando la regione costante formando un nuovo isotipo che può reclutare delle cellule effettrici diverse , che saranno più efficaci contro un determinato patogeno (rispetto ad un altro isotipo) .

- **Funzioni** : gli anticorpi neutralizzano tossine batteriche , batteri e virus andando ad impedire che questi vadano ad interagire con i propri recettori , prevenendo dunque il legame . Gli anticorpi inoltre opsonizzano assieme al complemento i microbi in modo tale da rendere maggiormente fagocitabile quel microrganismo (IgG che lega CD64 e complemento che lega CR1) . Attiva la cascata del complemento grazie ad IgG ed IgM e attiva la citotossicità cellulare mediata da anticorpo ADCC .

Anticorpi Monoclonali

Sono stati ideati con lo scopo di poter produrre illimitatamente un anticorpo diretto contro uno specifico antigene . Le cellule B non possono vivere illimitatamente , quindi questa viene ottenuta mediante fusione con delle cellule neoplastiche , per creare un ibridoma immortale che fa solo un anticorpo e questi anticorpi sono gli anticorpi monoclonali .

Le linee cellulari di mieloma crescono bene in coltura normale , ma non sopravvivono in terreni di selezione , in cui è stato rimosso qualcosa di fondamentale per la loro sopravvivenza .

Le cellule animali sintetizzano il DNA a partire da precursori come nucleotidi purinici e timidilato sintetasi ex novo , in una via che richiede tetraidrofolato ; farmaci ad azione antifolica come aminopterina bloccano l'attivazione del tetraidrofolato , inibendo di fatto questa via vengono così indotte però a sopperire alla mancanza di tetraidrofolato utilizzando una via alternativa per sintetizzare DNA e potersi replicare ; in questa via alternativa le cellule sintetizzano purina a partire da ipoxantina esogena , mediante l'enzima HGPRT ipoxantina-guanina forforibosiltrasferasi , mentre il timidilato sintetasi viene sintetizzato mediante l'enzima timidina chinasi TK. Quindi le cellule B trattate sopravvivono in queste condizioni utilizzando la via alternativa in un terreno definito **HAT** (Ipoxantina-Timidina-Aminopterina) .

Le cellule tumorali anche sopravviverebbero ma possono essere rese mancanti dei geni per HGPRT o TK , quindi in condizioni HAT non sopravvivono ; se però si fondono con cellule B di un altro terreno si salvano perché utilizzano il DNA ospite per potersi replicare e creare questi ibridomi .

Si immunizza un topo con tale antigene e si isolano dalla milza o dai linfonodi i linfociti B che verranno poi utilizzati per la fusione .

Le linee di mieloma sono il miglior partner , in quanto si fondono e danno origine a ibridi stabili . Vengono inserite tutte e due le linee in un terreno HAT e delle mielomatose sopravviveranno solamente quelle cellule che si fonderanno con le B per generare gli ibridomi , mentre le B non fuse dopo un po' di tempo moriranno perché non immortali .

Il metodo di screening dipende dall'antigene usato , comunque per gli antigeni solubili si usa la tecnica ELISA (immunoenzimatica) o RAI (radioimmunologica) .

Gli anticorpi monoclonali vengono usati in molti modi :

- Identificazione di marcatori caratteristici di un fenotipo particolare tipo di cellula , o CD
- Immunodiagnosi : molte infezioni vengono diagnosticate mediante la presenza in circolo di determinati anticorpi e mediante l'uso di test immunologici che utilizzano i monoclonali vengono riconosciuti
- Diagnosi dei tumori
- Terapia . Alcuni anticorpi vengono usati contro il TNF nell'artrite reumatoide ; contro il CD20 per il trattamento delle leucemie B ; contro il recettore 2 del fattore di crescita epidermico ; in pazienti con tumore della mammella ; anticorpi diretti contro il fattore di crescita dell'endotelio vascolare , in pazienti con cancro al colon .

Capitolo 5

Complesso Maggiore di Istocompatibilità

Il complesso maggiore di istocompatibilità sono delle speciali proteine che presentano l'antigene ai Linfociti

Ci sono due classi di **MHC**, la classe **I** (su tutte le cellule nucleate) che andrà a presentare l'antigene ai Linfociti T CD8 e la classe **II** (sulle APC) che andrà a presentare l'antigene ai Linfociti T CD4

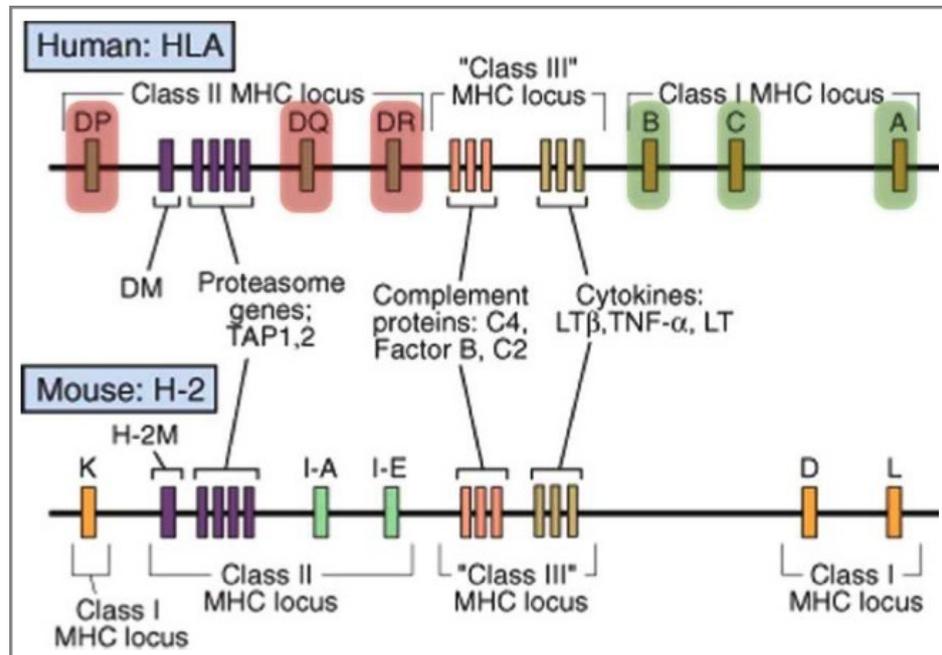
Scoperta dell'MHC

Furono scoperte per via del rigetto dei trapianti e la chiave per comprendere questo fatto è il concetto di **polimorfismo**. Alcuni geni in un individuo sono rappresentati da un'unica sequenza di DNA in tutti i membri di una specie ed allora si parla di geni non polimorfi, mentre altri geni esistono in varianti, forme diverse comuni (che possono presentarsi in più individui di una stessa popolazione) e quindi sono stati chiamati polimorfi (molte forme dal greco) ed ogni variazione o sottotipo di questi geni polimorfi è chiamata **allele**. Un individuo può avere in un determinato locus genico lo stesso allele in entrambi i cromosomi ed allora si parla di omozigosi, mentre se si possiedono all'interno dello stesso locus genico alleli diversi allora si parla di eterozigosi.

Utilizzando tecniche genetiche ('40 Snell), topi vennero fatti incrociare con i propri fratelli e dopo circa 20 generazioni uscivano fuori dei topi identici geneticamente e quei topi quindi erano omozigoti per tutti i locus genici, e venivano chiamati (singenici = geneticamente uguali) topi inbred. Visto che sono inbred, anche nei geni polimorfi saranno uguali, mentre altri topi all'interno della stessa popolazione che esprimono alleli diversi sono chiamati **allogenic** (due individui della stessa specie ma geneticamente differenti).

Il sistema immunitario distrugge il Trapianto, attraverso il rigetto, e si è notato che il trapianto tra ceppi inbred era possibile visto che sono geneticamente identici, mentre tra ceppi diversi il rigetto

era molto comune e quindi si è pensato che il rigetto fosse provocato da un carattere ereditario e scoprirono che i geni responsabili del rigetto si trovavano per i topi all'interno di un locus genico del cromosoma 17 e venne chiamato H-2, perché codificava per un antigene polimorfo del gruppo sanguigno chiamato antigene II e quindi fu chiamata regione di Istocompatibilità II, infatti Istocompatibilità sta a significare compatibilità di tessuti.



I geni dell'MHC controllano la risposta immunitaria degli antigeni proteici ed hanno così un ruolo fondamentale nel rigetto dei trapianti e quindi furono messi sotto osservazione e furono mappati così che adesso sappiamo quali sono questi geni responsabili della codifica degli MHC. Nell'uomo queste molecole furono scoperte sempre nell'ambito dei trapianti e quei sieri che contenevano anticorpi diretti contro gli antigeni espressi dai leucociti del donatore allogenici furono chiamati alloantisieri, gli anticorpi alloanticorpi e gli antigeni alloantigeni. Furono trovati quei geni che rispondevano agli alloanticorpi sul braccio corto del cromosoma 6 e siccome venivano espressi dai leucociti umani furono chiamati **HLA** (antigeni leucocitari umani) ed i primi scoperti con metodi puramente sierologici furono chiamati HLA-A, HLA-B, HLA-C; ne furono scoperti altri poi con quella chiamata reazione leucocitaria mista o MLR, un test per il riconoscimento delle cellule allogeniche da parte dei linfociti T ed il primo gene scoperto fu chiamato HLA-D in una regione adiacente ad HLA-A e la proteina codificata fu chiamata HLA-DR(related); in seguito furono mappati altri due geni che codificavano proteine strutturalmente simili alla DR e per la vicinanza nell'alfabeto furono chiamate HLA-DP e HLA-DQ.

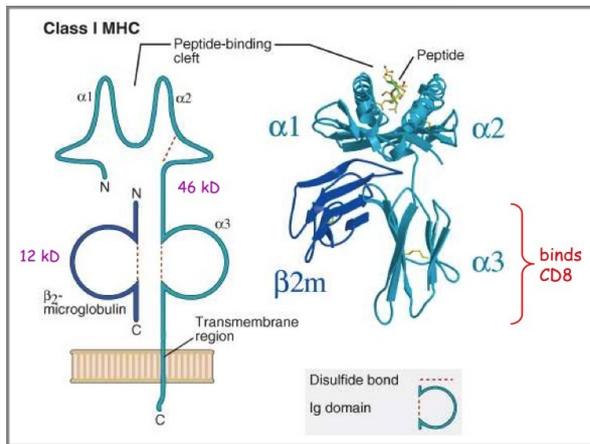
I loci del topo sono correlati a quelli dell'uomo, quindi quelli che nel topo sono H-2K, H-2D e H-2L sono omologhi ai geni HLA-A, HLA-B, HLA-C, codificano per l'MHC di classe I (regione di classe I); mentre i geni Ir (Geni della risposta immunitaria) del topo I-A ed I-E sono omologhi ai geni scoperti con l'MLR HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ codificano per l'MHC di classe II e sono identificabili come geni MHC di classe II (regione di classe II); parliamo di regioni perché questi loci non codificano esclusivamente per le MHC, ma anche per altro e ne parleremo dopo.

I geni MHC sono *i geni più polimorfi* presenti nel genoma umano, infatti per alcuni HLA sono stati identificati circa 250 alleli, ma differiscono lievemente; i geni MHC sono espressi in modo

codominante in ogni individuo , quindi ciascun soggetto esprime sia gli alleli MHC ereditati dalla madre sia quelli ereditati dal padre ; il set di geni di ciascun individuo viene definito aplotipo e ciascuna serie di geni MHC viene definita aplotipo MHC ; tutti i soggetti sono eterozigoti , hanno due aplotipi HLA (madre e padre)

Struttura delle molecole MHC

Tutte le molecole di MHC hanno in comune determinate caratteristiche , infatti ciascuna molecola MHC che sia di tipo I o II presenta una tasca all'interno della quale sarà contenuto l'antigene peptidico , una coppia di domini Ig ancorati alla cellula da un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico ; le MHC presentano delle regioni polimorfe e delle regioni non polimorfe come già detto più volte ; le regioni polimorfe vedremo che si concentrano a livello della tasca , mentre le regioni non polimorfe in uno dei domini Ig (coppia) che andranno poi a legare il corecettore del Linfocita T CD4 o CD8 .



Molecole MHC di Classe I

Le molecole MHC I sono formate da due catene peptidiche legate non covalentemente ; presentano una catena pesante di circa 44-47 kD o **Catena Alfa** , codificata dal locus genico dell'MHC ed una catena leggera chiamata **Beta2-Microglobulina** non codificata dal locus genico MHC , ma nel cromosoma 15 , di circa 12 kD . Tre quarti del polipeptide si trova al di fuori della cellula che lo presenta , quindi si ritrova in posizione extracellulare , poi vediamo un breve segmento transmembrana idrofobico e un segmento citoplasmatico .

I segmenti amino-terminali sono formati da due alfa eliche di circa 90 residui chiamate rispettivamente **alfa 1** ed **alfa 2** che andranno a formare le pareti della tasca che conterrà l'antigene e contribuiscono a formare una piattaforma costituita da un foglietto Beta di filamenti antiparalleli , 8 filamenti antiparalleli che formeranno il pavimento di questa tasca , che andrà a sostenere queste pareti di alfa eliche ; insieme quindi il pavimento e le alfa eliche costituiscono la tasca , che per l'MHC I potrà ospitare un segmento della grandezza compresa tra 8-11 aminoacidi in una conformazione flessibile ed estesa ; la tasca di questo MHC è chiusa superiormente e quindi non vi possono alloggiare strutture più grandi di quelle consentite (a differenza dell'MHC II) , quindi questi antigeni verranno processati e sminuzzati fino a raggiungere la grandezza consentita . I residui polimorfi che saranno responsabili per il riconoscimento del peptide e del riconoscimento da parte del linfocita T si troveranno sulle due alfa eliche e all'interno della tasca .

Segue poi nella catena pesante alfa un segmento formato da un dominio Ig chiamato **alfa 3** importante perché sarà quello che contiene un'ansa che andrà a legare il corecettore del Linfocita T CD8 ; all'estremità carbossi-terminale di alfa 3 vediamo una porzione transmembrana di circa 25 aminoacidi idrofobici che andranno così a inserirsi nello strato lipidico della membrana plasmatica .

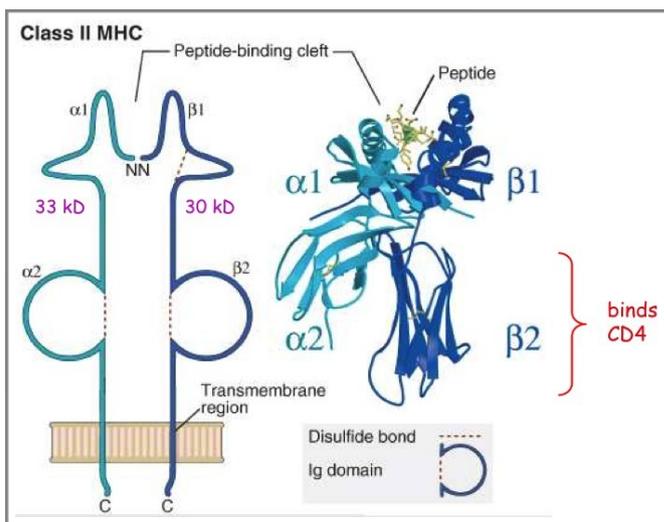
Segue poi nel citoplasma una sequenza di 30 residui aminoacidici in grado di interagire con i fosfolipidi del foglietto interno della membrana plasmatica e di fissare così le molecole MHC .

La catena leggera come detto è formato dalla Beta2-Microglobulina , scoperta nell'urina umana e chiamata così Beta2(per la sua mobilità elettroforetica)-Micro(per la grandezza)-Globulina(per la sua solubilità) ; questa andrà ad interagire con l'alfa 3 in modo non covalente .

La molecola MHC I formata è un eterotrimerico composto così da una catena alfa pesante una catena leggera di Beta2-Microglobulina e il peptide antigenico legato alla tasca ; sì , legato alla tasca perché questa interazione va a stabilizzare il legame tra la Beta2-Microglobulina e la catena pesante e viceversa il legame tra le due catene andrà a rafforzare il legame con il peptide antigenico della tasca ; quindi visto che il peptide serve per stabilizzare la molecola , questa verrà esposta sulla membrana cellulare già formata , quindi col peptide già annesso .

La maggior parte degli individui è eterozigote per i geni MHC , quindi ognuno esprime sei differenti molecole di MHC I , che contengono catene alfa derivate dai due alleli dei geni HLA-A , HLA-B e HLA-C ereditati dai genitori .

Molecole MHC di classe II



Le molecole MHC II sono composte da due catene , una **catena alfa** di circa 32-34 kD e una **catena beta** di circa 29-32 kD legate in modo non covalente ; i geni che codificano per queste due catene , a differenza dell' MHC I , si trovano nel locus genico dell' MHC .

Le due catene hanno i segmenti amino terminali che interagiscono in modo da formare una **tasca** , sensibilmente più spaziosa rispetto all' MHC I , infatti potranno ospitare peptidi di grandezza che variano tra 10-30 aminoacidi e il motivo principale di questo fatto è che la parte superiore della tasca non è ostruita dalle

pareti laterali formate dalle alfa eliche ; nelle porzioni amino-terminali delle due catene vediamo quindi delle alfa eliche rispettivamente alfa 1 e beta 1 che continuano verso il basso andando a

formare il pavimento ; il pavimento della tasca è formato da quattro stringhe provenienti dalla catena alfa e quattro stringhe provenienti dalla catena beta , quindi interagiscono per formare il pavimento ; il polimorfismo maggiore si concentra nella catena beta .

Proseguono le due catene con un dominio Ig non polimorfo ciascuna , chiamati alfa 2 e beta 2 , dove quest'ultima , beta 2 andrà a legare il corecettore CD4 del linfocita T CD4 .

Le estremità carbossi-terminali di questi domini continuano con una regione transmembrana idrofobico di 25 aminoacidi che termina con dei residui basici e infine una regione citoplasmatica composta da aminoacidi idrofili .

La molecola di MHC II completamente assemblata è un eterotrimerico composto da una catena alfa , una catena beta e il peptide antigenico associato ; anche qui come per l'MHC I l'espressione stabile necessita del legame , quindi saranno espresse solo molecole già assemblate col peptide .

L'uomo eredita da ogni genitore un gene DPB1 e un gene DPA1 , ognuno dei quali codifica rispettivamente per la catena beta ed alfa della molecola HLA-DP ; eredita anche un gene DQB1 e DQA1 ; infine eredita un gene DRA1 , DRB1 e separatamente DRB duplicato che codificherà per DRB3,4 o 5 . In questo modo ogni individuo eterozigote eredita 6 o 8 alleli per MHC II , 3 o 4 da ogni genitore (un set DP , un set DQ e uno o due di DR) .

Legame dei peptidi alle molecole MHC

A differenza dei linfociti T , le molecole di MHC mostrano una certa promiscuità nel legame , infatti la specificità è una caratteristica fondamentale del linfocita e più in particolare del suo recettore .

Ogni molecola di MHC può ospitare nella sua tasca un solo peptide alla volta , sebbene possa legare più peptidi differenti in momenti diversi , a rimarcare la promiscuità dell'MHC e questo dato non sorprende più di tanto visto che ciascun individuo contiene soltanto poche molecole di MHC , di cui 6 di classe I e 20 di classe II per un eterozigote , e queste devono essere in grado di presentare peptidi derivanti da un numero gigantesco di antigeni (10^9) .

I peptidi che si legano all' MHC hanno delle caratteristiche strutturali che favoriscono il legame con la tasca , come può essere la dimensione , 8-12 I e 10-30 II , inoltre i peptidi aminoacidici contengono dei residui che permettono interazioni complementari tra il peptide e la forma allelica dell' MHC .

L'associazione tra il peptide e la molecola MHC ha una velocità di dissociazione molto lenta , infatti questi complessi peptide-MHC sono molto stabili , in modo tale da poter rimanere a lungo sulla membrana dell'APC e consentire così di assicurare al linfocita T specifico per quell'antigene il tempo necessario per il suo riconoscimento , visto che di linfociti T specifici ce ne sono pochissimi in mezzo

alla moltitudine e quindi richiede del tempo , tempo garantito da questa lentezza di velocità di dissociazione .

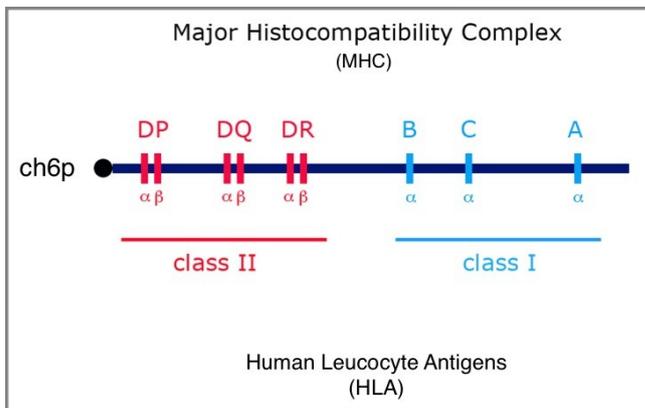
Le molecole di MHC non distinguono tra peptidi self e peptidi non-self , ma sarà il linfocita T che dovrà riconoscere la differenza ; i linfociti T nel loro processo maturativo nel timo hanno imparato a riconoscere la differenza , o meglio quei linfociti T che non riconoscevano il self non sono mai usciti vivi dall'organo ; il processo di esposizione dei peptidi è un processo costitutivo e continuo , quindi potranno essere esposte anche molecole self ; per questo anche si parla di promiscuità delle MHC .

Il legame dei peptidi all'MHC è un'interazione non covalente tra le catene laterali e la tasca dell' MHC ; il peptide andrà a riempire la tasca associato a molecole di acqua , ma il foglietto beta del pavimento mostra delle "nicchie" all'interno delle quali si andranno a posizionare e ad inserire le catene laterali del peptide , andando a legare aminoacidi complementari tramite interazioni di tipo idrofobico ; questi residui presenti nel peptide (al centro o estremità del peptide) saranno chiamati **residui àncora** ; alcuni peptidi non sono àncora , ma utilizzano come legami dei ponti idrogeno o ponti ionici .

Organizzazione Genomica dell' MHC

Il locus dell'MHC nell'uomo è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 , mentre la Beta2-Microglobulina viene codificata da un gene presente sul cromosoma 15 .

Esistono tre regioni principali nel locus genico dell' MHC :



Regione di classe 1 : Questa regione comprende i geni *HLA-A* , *HLA-B* , *HLA-C* , quindi quei geni che andranno a codificare per gli MHC I ; si trovano nella porzione più telomerica del locus MHC

Regione di classe 2 : Questa regione invece si trova nella regione più centromerica del locus MHC e andrà a contenere quei geni che specificano per le MHC II , quindi *HLA-DP* , *HLA-DQ* e *HLA-DR* ; conterrà poi dei geni che codificano per il *proteasoma* fondamentale per la

processazione dell'antigene nella via endogena (LMP-2 e LMP-7) ; ci saranno geni che codificano per la proteina *TAP* anch'essa molto importante nel processamento della via endogena , la proteina chiamata trasportatore associato con la processazione dell'antigene e sono geni *TAP 1* e *TAP 2* molto vicini ad LMP-2 e LMP-7 (sia questi che TAP sono potenziati dall' IFN-gamma) ; infine contengono un gene molto importante perché andrà a codificare per una proteina responsabile della sostituzione o scambio del residuo della catena invariante CLIP col peptide antigenico nella penultima fase del

processamento dell'antigene della via esogena , la proteina HLA-DM una molecola simile all' MHC II codificata dal gene omonimo .

Regione di classe 3 : Infine un ultimo gruppo di geni all'interno di questo locus andrà a specificare per delle citochine , come il tumor necrosis factor alfa (TNF alfa) , i geni per le proteine della risposta allo shock termico (HSP-70) e geni dei fattori del complemento (C4,C2,fattore B) .

Espressione delle molecole MHC

Come detto le MHC sono fondamentali per presentare l'antigene al linfocita T quindi dovranno essere espresse con una determinata frequenza ; le molecole di classe I sono espresse costitutivamente da tutte le cellule nucleate , mentre le molecole di classe II sono espresse solamente dalle APC (Cellule dendritiche , Linfociti B e Macrofagi) ; questa stretta relazione è associata alle funzioni che dovranno esprimere i Linfociti , infatti la funzione del linfocita citotossico (CD8) sarà quella di uccidere microrganismi intracellulari come un virus e visto che i virus possono presentarsi in qualsiasi tipo di cellula nucleata (perché utilizzano i macchinari genetici della cellula ospite per potersi replicare) , i ligandi dei CD8 sarà più conveniente (come è infatti) che si trovino su tutte le cellule nucleate ; i linfociti CD4 invece andranno a potenziare le funzioni delle APC , quindi attivare i macrofagi ad eliminare i microbi extracellulari fagocitati e di attivare i linfociti B a produrre anticorpi per eliminare i microrganismi extracellulari .

L'espressione delle MHC può essere aumentata dalle citochine durante la risposta immunitaria innata e specifica :

IFN-alfa -beta e -gamma incrementano il livello di espressione delle MHC I , così come anche TNF e LT (linfotossina) ; di questi gli IFN vengono prodotti precocemente nella risposta innata contro molti virus , mentre il TNF e LT sono prodotte in risposta ad infezioni microbiche ; in questo modo la risposta innata andrà a stimolare la risposta adattativa

IFN-gamma è la citochina principale per stimolare l'espressione delle molecole di classe II sulle APC come DC e macrofagi ; questo viene prodotto dalle NK in risposte innate e dagli T attivati nelle adattative ; la capacità dell'IFN-gamma di aumentare l'espressione delle MHC II è un meccanismo di amplificazione dell' immunità specifica ; questa citochina è fondamentale perché andrà ad agire sui meccanismi di trascrizione genica , andando ad aumentare l'espressione di un fattore di trascrizione chiamato **CIITA** (induttore di trascrizione della classe II) ; questo fattore assieme ad altre proteine andrà a legarsi ai geni promotori della classe II e promuove così un'efficiente trascrizione , facendo aumentare di conseguenza l'espressione delle molecole di MHC II ; è importante sapere che i topi knockout per questo fattore di trascrizione , mostrano l'assenza dell'espressione delle MHC II nelle DC e cellule B e l'incapacità dell'IFN-gamma di indurre la loro

espressione nei macrofagi . Una mutazione per il gene che codifica per CIITA porta ad una patologia chiamata sindrome del linfocita nudo o deficit di espressione delle molecole di MHC II .

Capitolo 6

Processazione e Presentazione dell' Antigene ai Linfociti T

Le APC sono le cellule che presentano l'antigene ai Linfociti T , perché le risposte dei Linfociti cominciano a partire dal riconoscimento dell'antigene (che sia una risposta umorale o cellulo mediata è indifferente , serve il riconoscimento dell'antigene)

Caratteristiche generali degli antigeni riconosciuti dai Linfociti T

I linfociti T riconoscono (per la maggior parte) antigeni esclusivamente in forma proteica o meglio peptidica , perché sono specifici per la sequenza aminoacidica di quel peptide antigenico ; i Linfociti B invece riconoscono non solo peptidi , ma anche proteine , lipidi polisaccaridi e acidi nucleici , quindi per attivare la risposta umorale l'origine può non essere proteica e le cellule B riescono a riconoscere determinanti di tipo conformazionale (come può essere la configurazione di una proteina) , mentre come detto le T solo la sequenza .

I Linfociti T riconoscono i peptidi solamente quando questi vengono espressi sulla superficie delle APC presentati dalle molecole MHC e non solo , perché queste MHC devono appartenere all'individuo stesso , quindi devono essere self , autologhe , questa è la restrizione dell'MHC .

I Linfociti TCD4 riconoscono peptidi di derivazione extracellulare , presentati esclusivamente da molecole MHC II mentre i CD8 molecole di derivazione intracellulare presentate da MHC I ; esiste inoltre un'altra via di presentazione che riguarda le CD1 , delle molecole che andranno a presentare antigeni lipidici alle NK-T .

Cellule che presentano l'antigene

Hanno due funzioni principali :

- 1) **Processare** l'antigene : devono captare l'antigene proteico , trasformarlo in un antigene peptidico per poterlo assemblare su di un MHC e presentarlo al linfocito T
- 2) Produrre **molecole costimolatorie** : le APC forniscono ai Linfociti stimoli ulteriori , rispetto a quelli forniti dal recettore TCR , necessari per la completa risposta (sopravvivenza e amplificazione risposta)

Le APC quindi riconoscono l'antigene attraverso i propri recettori di membrana , come un Toll-like , e vanno a provocare l'aumento delle molecole MHC e molecole costimolatorie aumentando l'efficienza di presentazione dell'antigene ; l'ingaggio dell'antigene inoltre induce le APC a produrre citochine che andranno a stimolare i linfociti T ; come ulteriore conseguenza , le APC che sono attivate cominciano la migrazione verso un organo linfoide secondario in modo tale da assicurarsi di incontrare un Linfocita da attivare e in questo viaggio cominciano ad esprimere dei recettori per delle chemochine prodotte in tali sedi , ed i linfociti avranno gli stessi recettori di quelle APC .

Le APC più efficaci nell'attivare CD4 e CD8 sono le cellule dendritiche ; i macrofagi presentano l'antigene ai CD4 nella cellulo mediata e le cellule B ai linfociti CD4 nella umorale ; queste tre classi di cellule possiedono le molecole MHC II ed esprimono le molecole costimolatorie quindi sono chiamate APC professionali perché in grado di attivare i CD4 ;

Le cellule dendritiche si trovano in organi linfoidi , negli epitelii della cute , del tratto intestinale e delle vie aeree e negli organi parenchimatosi ; negli epitelii della cute il tipo più rappresentativo è senz'altro la cellula di Langerhans dell'epidermide che si trova perennemente in condizioni di riposo fino a che non incontra un'antigene ed allora comincia la sua attivazione e migrazione verso gli organi linfoidi secondari dove troverà un linfocito T , secernono citochine dopo il contatto con l'antigene e perdono di adesività verso l'epidermide e cominciano ad esprimere quei recettori per chemochine come CCR7 che andrà a riconoscere e legare la chemochina CCL19 e CCL21 ; quindi nel suo viaggio verso l'organo linfatico comincia una sua attivazione personale passando da cellula specializzata nella cattura dell'antigene a cellula specializzata nella presentazione dell'antigene ad un linfocita T naive .

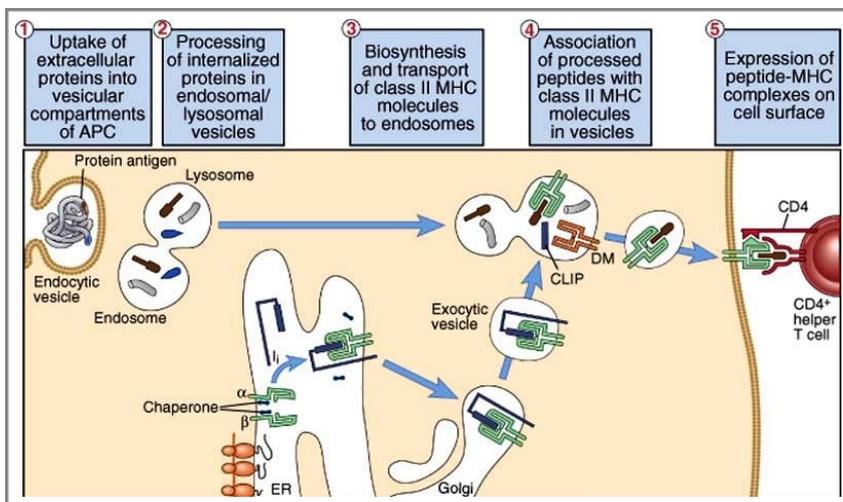
Le cellule dendritiche sono le APC più efficaci per determinati motivi , come il trovarsi in delle posizioni strategiche nel senso di trovarsi nelle vie di accesso di patogeni e negli organi colonizzati da questi , poi il fatto di esprimere recettori capaci di captare gli antigeni , possiedono recettori per chemochine che condividono con la cellula T e che inducono la sua migrazione delle aree T e per ultima cosa , il fatto di esprimere alti livelli di molecole costimolatorie per attivare il linfocita naive .

Nelle risposte cellulari, i macrofagi presentano l'antigene al linfocita CD4 che a sua volta andrà ad agire sul macrofago andando a potenziare la sua attività microbica, infatti normalmente questa cellula non esprime alti livelli di MHC II e molecole costimolatorie, ma l'esposizione alla citochina IFN-gamma come già detto andrà a potenziare l'azione trascrittiva per le molecole e quindi andrà ad aumentare l'efficienza della presentazione dell'antigene e l'attivazione dei linfociti T.

Biologia della processazione dell'antigene

Le vie di processazione hanno come scopo quello di trasformare le proteine derivate dall'ambiente extracellulare o intracellulare in peptidi, che possano alloggiare nella tasca degli MHC, per essere presentati al linfocita T. Questi meccanismi generano quindi dei peptidi adatti ad alloggiare nella tasca e inoltre sono deputati a disporre questi peptidi nei compartimenti cellulari compatibili con lo stesso MHC che dovrà legarli, perché questa fase avverrà prima dell'esposizione della molecola di MHC come già detto. Gli antigeni che vengono generati da un processamento di proteine derivate dall'ambiente extracellulare vengono caricati sulle MHC II, mentre quegli antigeni di derivazione intracellulare vengono caricati su MHC I.

- Pathway esogeno e processazione per le molecole MHC II



1) Trasporto delle proteine extracellulari nei compartimenti vascolari delle APC:

I microbi vengono catturati dalle APC dall'ambiente esterno e vengono internalizzati in vescicole chiamate **fagosomi**, che si fondono coi lisosomi per formare i fagolisosomi; gli antigeni proteici vengono internalizzati negli **endosomi**, delle vescicole intracellulari rivestite da membrana a un pH acido contenenti enzimi proteolitici e sono in

comunicazione coi lisosomi.

2) Processazione delle proteine internalizzate nelle vescicole endosomiali e lisosomiali:

Le proteine vengono degradate enzimaticamente negli endosomi e nei lisosomi, per generare peptidi in grado di legarsi alle tasche degli MHC II. La degradazione viene mediata dalle catepsine e inibitori di questi specifici enzimi bloccheranno la presentazione dell'antigene. Le catepsine sono delle tiol- e aspartil-proteasi con ampia specificità di substrato che rivestono un ruolo importante nella via di presentazione.

3) Biosintesi e Trasporto delle molecole MHC II agli endosomi :

Le MHC II vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico e trasportate agli endosomi associate ad una **catena invariante Ii** che occupa la tasca del legame col peptide . Le catene alfa e beta delle MHC II vengono assemblate in maniera coordinata e si appaiano a livello dell'ER , ma i dimeri nascenti sono instabili (manca il peptide) e il loro ripiegamento viene favorito da chaperonine nell'ER , come la calnexina ; la catena Ii si associa agli eterodimeri alfa-beta nell'ER . La catena Ii è un trimero di tre subunità di 30 kD , ciascuna delle quali lega un eterodimero alfa-beta (quindi una Ii per tre alfa-beta) , andando ad interferire di fatto col legame al peptide ; in questo modo le molecole MHC II non possono legare peptidi presenti nell'ER che restano così disponibili solamente per l'associazione con le MHC I . La catena Ii inoltre promuove il ripiegamento e l'assemblaggio delle MHC II e soprattutto le indirizza verso le vescicole endosomiali , dove le proteine internalizzate sono state degradate in peptidi ; diversamente dalle proteine destinate alla secrezione , le MHC II escono dal Golgi e vanno negli endosomi e lisosomi e durante il passaggio verso la superficie cellulare , le vescicole che contengono MHC II incontrano e si fondono con quelle che contengono gli antigeni peptidici . Questo è l'evento finale di questa fase , l'incontro e la fusione di queste vescicole . Sono state individuate con studio di microscopia delle vescicole che contengono tutte quelle componenti necessarie per l'associazione dei peptidi all'MHC II , come le MHC stesse , enzimi , i peptidi , i frammenti della catena invariante e una molecola HLA-DM (importantissima) ; queste vescicole chiamate **MIIC** (compartimento MHC II) hanno un aspetto multilamellare caratteristico .

4) Associazione dei peptidi processati con le MHC II nelle vescicole :

La catena invariante Ii viene rimossa dall'azione combinata degli enzimi proteolitici (quelli che erano presenti negli endosomi del peptide) e della molecola HLA-DM e quindi i peptidi antigenici possono legarsi alla tasca dell' MHC II .

Negli endosomi sono presenti le cathepsine S , che agiscono sulla catena invariante degradandola e lasciando solo uno spezzone di 24 aminoacidi denominati come **CLIP** (peptide invariante associato alla classe II) . Questo si sistema nella tasca in maniera analoga al peptide antigenico ; a questo punto deve essere rimosso CLIP e la molecola HLA-DM ha un ruolo determinante perché andrà ad agire come scambiatore di peptidi , facilitando la rimozione di CLIP e la sua sostituzione coi peptidi antigenici (**HLA-DM** viene codificata dalla regione di classe II e si colocalizza col le molecole II nel MIIC ; queste non sono polimorfe e non si associano con Ii e né sono espresse sulla superficie cellulare) .

Topi ko per DM hanno quindi un deficit nella presentazione dell'antigene . Rimosso CLIP , i peptidi internalizzati si associano ; ricordiamo che la tasca è aperta superiormente , quindi possono associarsi peptidi di grandi dimensioni o addirittura intere proteine , che possono essere poi

successivamente tagliate da enzimi proteolitici fino a raggiungere la dimensione giusta per alloggiare nella tasca (11-30 aa) .

5) Espressione dei complessi MHC II-peptide sulla superficie delle APC :

Le MHC II sono stabilizzate dal legame col peptide e il complesso eterotrimerico viene trasportato alla membrana dell'APC , dove vengono esposti per il riconoscimento da parte dei T CD4+ .

Un piccolo numero di MHC II che riconoscono l'antigene è sufficiente ad attivare la risposta cellulare T specifica ; è stato calcolato che bastano circa 100 complessi di un particolare peptide combinato all'MHC di classe II e questo numero è circa meno dello 0,1% di tutte le molecole espresse da una singola APC ; il riconoscimento delle cellule T porta alla redistribuzione delle MHC sulla superficie delle APC in modo da creare un addensamento verso la cellula T che favorisce il riconoscimento .

- Pathway endogeno e processazione per le molecole MHC I

In questa via entrano solamente quegli antigeni di derivazione citosolica e quindi proteine autologhe , che vengono processate e caricate su MHC I per il riconoscimento dei CD8+ .

1) Produzione degli antigeni nel citosol :

I peptidi antigenici di questa via , come detto , derivano da proteine presenti nel citosol , la maggior parte della quale viene sintetizzata endogenamente dalle cellule nucleate . Antigeni estranei possono essere causati da un virus o microbi intracellulari che infettano la cellula , o possono essere cellule tumorali , quindi geni mutati o iper-espresi possono produrre antigeni proteici .

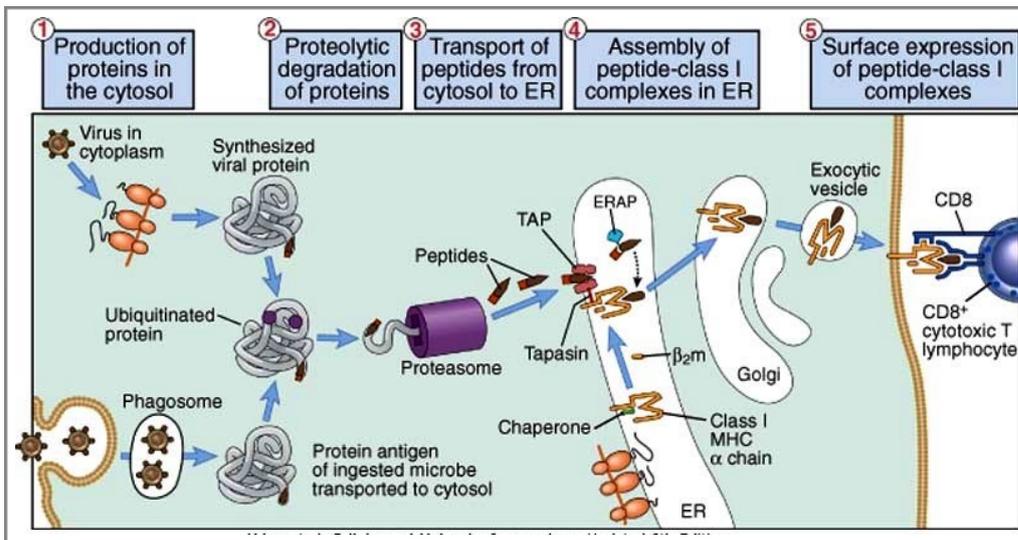
2) Degradazione proteolitica delle proteine citosoliche :

I peptidi intracellulari sono generati dai proteasomi . I proteasomi sono dei complessi enzimatici presenti in due forme principali che si trovano nel citoplasma di quasi tutte le cellule . La prima è una forma del peso di 700 kD che è formato da un cilindro composto da due anelli interni e due esterni coassiali ; ciascun anello ha sette subunità , tre delle quali (quelle centrali) hanno attività proteolitica; il proteasoma svolge una normale funzione di manutenzione , degradando proteine danneggiate o ripiegate male ; queste proteine vengono etichettate tramite ubiquitina , che facilita la loro degradazione , perché indica al proteasoma che devono essere degradate , visto che la testa del proteasoma le lega , quindi vengono rimosse dall'ubiquitina e tritate . La forma però probabilmente responsabile della produzione di antigeni intracellulari è un'altra , di peso 1500 kD , composta da una struttura di 700 kD e da numerose altre subunità che ne regolano l'attività proteolitica ; due delle subunità presenti sono chiamate LMP-2 e LMP-7 (codificate dai geni presenti nel locus genico MHC II) , nelle cellule trattate con IFN-gamma vi è un aumento di produzione di LMP-2 e -7 quindi l'interferone gamma andrà ad incrementare il processo di trascrizione per queste due subunità , che

vanno a sostituire altre due subunità nel proteasoma ; questo passaggio è fondamentale , perché provocherà delle modificazioni nel substrato tali che i peptidi generati abbiano dimensioni comprese tra i 6-30 aminoacidi con residui basici o idrofobici all'estremità C-Terminale ; queste due caratteristiche sono fondamentali e tipiche dei peptidi che vanno a legare le MHC I (dopo un'ulteriore spezzettamento) . Si può dire quindi che l'IFN-gamma promuove la presentazione dell'antigene .

Alcuni antigeni proteici non richiedono l'ubiquitinazione o l'azione del proteasoma per essere presentati da MHC I , per esempio alcune proteine neo-sintetizzate vengono degradate nell'ER .

3) Trasporto dei peptidi dal citosol all'ER :



I peptidi generati nel citosol sono trasportati da una proteina trasportatrice speciale nell'ER (citosol---->ER) , dove molecole MHC I neosintetizzate sono disponibili per legare i peptidi .

La molecola è la **TAP** (trasportatore associato con la presentazione dell'antigene) è un eterodimero i cui geni

TAP1 e TAP2 sono localizzati adiacentemente a quelli del proteasoma , quindi nella regione MHC II e IFN-gamma stimola la sua sintesi ; la TAP è situata prevalentemente sulla membrana dell' ER dove media il trasporto attivo ATP-dipendente di peptidi dal citosol al reticolo endoplasmatico ; le modificazioni indotte da IFN-gamma nel proteasoma facilitano il trasporto dei peptidi nell'ER (la proteina TAP trasporta in maniera ottimale peptidi che oscillano tra i 6 e i 30 aminoacidi contenenti in posizione C-Terminale residui basici o idrofobici) e contemporaneamente promuovono la trascrizione dei suoi geni ; sul lato interno della membrana plasmatica la TAP è legata in modo non covalente alle MHC I neosintetizzate per mezzo di una proteina di legame chiamata tapasina , quindi le MHC I sono localizzate strategicamente dove possono ricevere i peptidi .

4) Assemblaggio dei complessi peptide-MHC I nell' ER :

I peptidi trasportati nell'ER si legano alle molecole MHC I legate al dimero TAP . La catena alfa e la B2-Microglobulina vengono assemblate nell'ER , favorite nel ripiegamento da chaperonine presenti nell'ER , come calnexina e calreticolina . Quando il peptide entra nell'ER associato alla TAP , viene sminuzzato dalle aminopeptidasi residenti nell'ER (**ERAP**) fino a che non abbiano la dimensione adeguata per la tasca (8-11aa) ; il peptide così si lega nella tasca e il complesso MHC-peptide è in

grado di uscire dall'ER perché si stacca dalla tapasina e viene trasportato sulla superficie cellulare . I peptidi nell'ER ovviamente si legano preferenzialmente sulle MHC I per due motivi , infatti le molecole MHC II sono legate alla catena invariante e poi perché le MHC I sono legate alle TAP pronte per ricevere i peptidi dal citosol .

5) Espressione dei complessi peptide MHC I sulla superficie cellulare :

I complessi MHC-peptide migrano attraverso il complesso di Golgi e sono trasportati alla membrana cellulare da vescicole esocitiche . Una volta espressi andranno a legare i T CD8+ .

Significato fisiologico della presentazione dell'antigene in associazione all'MHC

Le vie di presentazione dell'antigene I e II campionano tutte le proteine che possono essere presentate ai linfociti T e la maggior parte di queste sono self o autologhe ; le proteine eterologhe sono infatti rare e possono derivare da agenti infettivi , tumori e antigeni estranei .

I peptidi self non stimolano la risposta a meno che non si tratti di autoimmunità ; le MHC campionano sia lo spazio extracellulare che intracellulare delle cellule nucleate e questo è importante perché i microbi possono ritrovarsi su entrambi i compartimenti . Nonostante gli antigeni estranei sono pochissimi , questi vengono riconosciuti dai linfociti T .

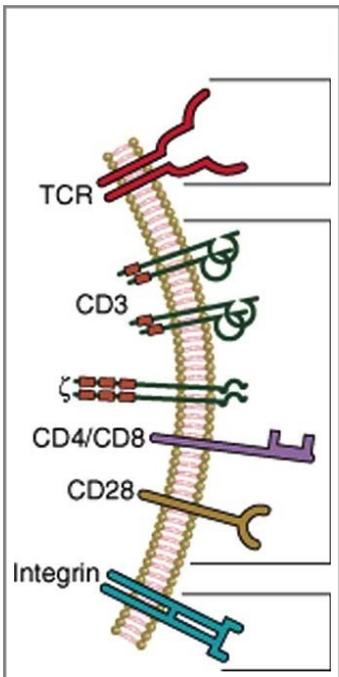
Le CD4+ andranno a potenziare l'attività microbica dei macrofagi e attiveranno le cellule B a produrre anticorpi , mentre le CD8+ uccideranno la cellula bersaglio , quindi le APC non sono solo le cellule che presentano l'antigene ma sono anche il bersaglio dell'immunità specifica .

Presentazione degli antigeni lipidici da parte di CD1

Le molecole NK-T riconoscono antigeni lipidici e glicolipidici presenti su molecole CD-1 , molecole simili alle MHC I , le quali legano lipidi e li espongono sulla superficie cellulare . Le NK-T che riconoscono gli antigeni lipidici possono avere un ruolo nella difesa contro i microbi (come i micobatteri che sono ricchi di componenti lipidiche) .

Capitolo 7

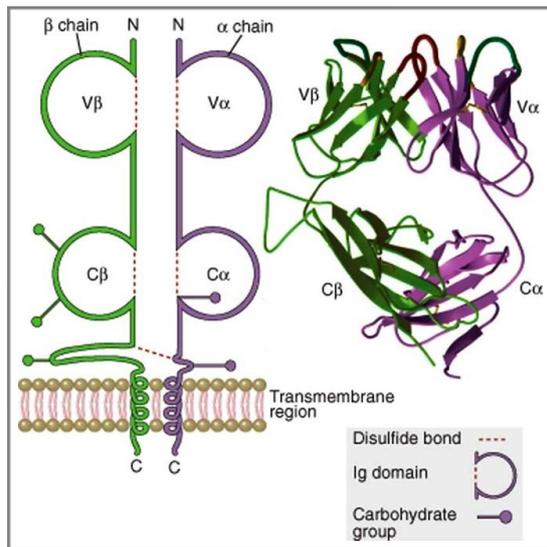
Recettori per l'antigene e molecole accessorie dei linfociti T



I linfociti T riconoscono gli antigeni esclusivamente legati ad MHC presenti sulla superficie cellulare di APC . L'inizio delle risposte del Linfocita T segue delle tappe , di cui la prima è il riconoscimento specifico dell'antigene , poi un'adesione stabile del Linfocita all'APC e poi la traduzione dei segnali di attivazione indotti dall'antigene. I linfociti hanno una doppia specificità , perché riconoscono i residui polimorfi delle MHC self e i residui del peptide antigenico ad essa legato ; i linfociti T hanno un recettore particolare chiamato appunto recettore dei linfociti T o **TCR** , un recettore clonalmente distribuito , cioè i cloni di linfociti T dotati di differente specificità esprimono TCR diversi . Questa era la prima fase , cioè il riconoscimento , ma per quanto riguarda la trasduzione del segnale , il TCR non ha un ruolo ben definito , ma ci sono altre molecole che andranno ad occuparsene ; queste molecole sono **CD3** e **Zeta** (per il linfocita B invece sono le Ig-alfa e Ig-beta)

; queste molecole assieme al TCR formeranno il cosiddetto Complesso del TCR ; i linfociti T esprimono inoltre altri recettori di membrana che non riconoscono l'antigene , ma partecipano alla risposta agli antigeni e queste sono chiamate **molecole costimolatorie** . Alcune di queste avranno il ruolo di *inviare* dei segnali che agiscono assieme al complesso TCR per ottimizzarne la risposta , saranno segnali di amplificazione della trasduzione , mentre altre avranno il ruolo di molecole di *adesione* (capitolo2) , permettendo così l'interazione tra APC e linfocita T , nella formazione di quella che sarà la sinapsi immunologica (sono anche coinvolte nella trasduzione del segnale).

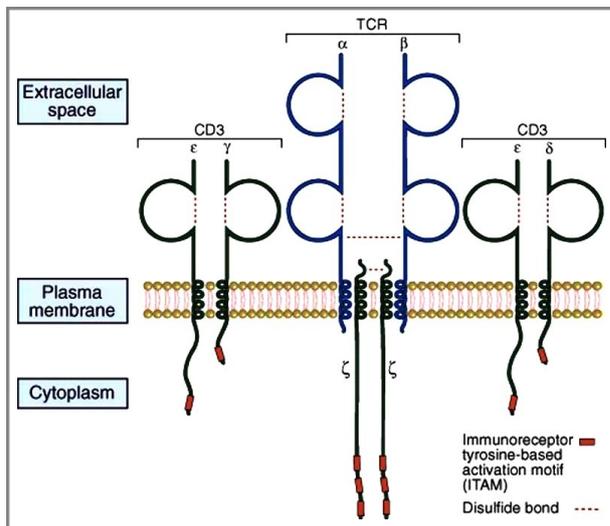
TCR AlfaBeta per peptidi associati alle molecole MHC



Il TCR è un eterodimero composto da due catene polipeptidiche transmembrana Alfa e Beta legate tra loro da ponti disolfuro. Sia A che B sono formate da un dominio all'N-Terminale Ig variabile (V), un dominio Ig costante (C), un dominio transmembrana idrofobico e un dominio citoplasmatico molto breve.

La porzione extracellulare è simile alla porzione Fab che lega l'antigene dell'anticorpo. Le regioni V delle A e B contengono nelle loro sequenze brevi tratti in cui si concentra la variabilità dei diversi TCR, le regioni ipervariabili che determinano

complementarietà con il complesso MHC-peptide, queste sono 3 sia per alfa che per beta e vanno a giustapporsi; inoltre la catena beta contiene una regione, una quarta regione ipervariabile che va a legare i Superantigeni. Delle regioni ipervariabili, che come detto sono 3, ce ne è una, la terza CDR3 che in alfa ha delle sequenze codificate dai geni V e J (joining) e in beta dai segmenti V, D (diversity) e J (inoltre nella CDR3 ci sono sequenze che non derivano dalla linea germinativa, ma sono codificate casualmente e queste sono regioni N e nucleotidi P; comunque la cosa più importante è che la gran parte della variabilità è concentrata in questa regione) segue poi una regione cerniera contenente residui di Cisteina che andranno a formare i ponti disolfuro tra le due catene; una regione transmembrana che avrà una particolarità, quella di avere dei residui carichi positivamente, nella catena alfa vediamo residui di Lisina e nella catena beta residui di Lisina ed Arginina e saranno questi che poi andranno a formare delle interazioni con le altre molecole del complesso TCR (tramite l'Acido Aspartico); per finire vediamo una breve coda citoplasmatica che non avrà la lunghezza necessaria per trasdurre i segnali del TCR, perché composta solo da 5-12 aminoacidi nella porzione C-Terminale e questa infatti sarà svolta dalle molecole di cui sopra. Il TCR quindi può essere somigliante all'anticorpo, ma presenta tre differenze sostanziali, una è quella che non può esistere in altra forma che come recettore di membrana, mentre l'anticorpo come sappiamo esiste in forma secreta e come recettore, quindi non presenta forme di secrezione il TCR, poi la seconda è che non presenta lo switch isotopico (un Linfocito B può produrre diversi isotipi di anticorpi (quindi IgG, M, A e via dicendo) con la stessa specificità per un determinato antigene e quando viene riconosciuto l'antigene il Linfocito può modificare le porzioni costanti per affinare la risposta, perché le porzioni Fc saranno responsabili di molte delle funzioni effettrici e quindi si parla di scambio di isotipo) e la terza che non potrà maturare l'affinità per l'antigene (la plasmacellula può produrre degli anticorpi che hanno la stessa specificità, ma sono pochissimi e quando uno di questi riconosce l'antigene per cui è stato creato vengono apportate delle modificazioni chiamate



ipermutazioni somatiche , che consentiranno la ricerca di una migliore affinità per quell'antigene , la perfezione) .

Il sito di legame per l'antigene del TCR è una superficie planare formata da sei sequenze CDR presenti nelle catene alfa e beta che fuoriescono obliquamente a formare una superficie per il riconoscimento del complesso MHC-peptide ; lo studio della conformazione ha evidenziato come il recettore si interfaccia con il complesso peptide-MHC in un orientamento obliquo che gli permette di inserirsi tra gli apici delle alfa eliche dell' MHC ; in questo

modo le anse del CDR1 sovrasteranno il peptide , le anse del CDR2 si troveranno al di sopra delle eliche dell'MHC e le anse CDR3 , quelle con maggiore variabilità invece nell'area centrale e la cosa più stupefacente è che il legame avviene solamente a livello di uno o due aminoacidi , al livello delle catene laterali , a rimarcare così la grande specificità del Linfocito T di discriminare antigeni diversi anche solo per un residuo ; il riconoscimento del peptide-MHC da parte del TCR è un legame di 10^{-7} quindi non un' affinità alta come quella dell'anticorpo ed infatti l' adesione stabile di questo complesso sarà mediata da quelle molecole di adesione di inizio capitolo

Proteine CD3 e Zeta del complesso TCR : Le proteine CD3 e Zeta sono associate in modo non covalente al TCR e la loro funzione principale è quella di mediare la trasduzione del segnale che origina dal riconoscimento dell'antigene da parte del TCR

CD3 : E' in realtà un complesso di 4 proteine omologhe , con struttura quasi identica , di cui due hanno una catena epsilon , una la catena gamma e una ha la catena delta ; sono dotate tutte quante di un dominio Ig extracellulare , un dominio transmembrana che possiede come già detto Acido Aspartico che avendo carica negativa (-) andrà ad interagire con la carica positiva portata dalla Lisina e Arginina del TCR nella sua regione transmembrana e possiedono infine un dominio citoplasmatico che ha una grandezza (tra epsilon , gamma e delta) compresa tra 44 e 81 aminoacidi responsabile della trasduzione e ognuna di queste code citoplasmatiche contiene una sequenza ITAM altamente conservata e importantissima , perché sarà questo dominio ad avere la funzione di trasduttore del segnale .

Zeta : E' costituita invece da una brevissima regione extracellulare , di circa 9 residui , poi una regione transmembrana ancora contenente Acido Aspartico (-) ed un lungo dominio citoplasmatico di circa 113 residui che contiene tre sequenze ITAM ; la catena Z nel complesso è presente come omodimero , quindi ce ne saranno due , le quali andranno a posizionarsi all'interno del TCR tra la catena alfa e beta e sono stabilizzate tra loro da un ponte disolfuro

Dominio ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ; ogni ITAM possiede due sequenze Tirosina-X-X-Leucina/Isoleucina , separate da un tratto di 6-8 aminoacidi quindi ancora Tirosina-X-X-Leucina/Isoleucina quindi (YXXL/I-----YXXL/I) dove X sta per qualunque aminoacido ; i domini ITAM svolgono la funzione di trasduzione non solo associati al complesso del TCR , ma anche in altre sedi come nelle code citoplasmatiche di numerose proteine di membrana coinvolte nella trasduzione del segnale dei linfociti , come le proteine Ig alfa e Ig beta che sono associate alle membrane dei linfociti B , le componenti di molti recettori Fc e del recettore attivatorio NKG2D delle cellule NK.

Il complesso del TCR deve essere assemblato prima di essere espresso , infatti un TCR che sia espresso senza il suo complesso , viene degradato , deve essere quindi assemblato nel RE e poi caricato sulla superficie cellulare .

Le CD3 e Zeta servono come cinghia di trasmissione tra il TCR e la risposta che devono dare , ossia quegli eventi biochimici che portano all'attivazione dei Linfociti T ed il primo evento sarà quello di fosforilazione dei residui di Tirosina presenti nelle ITAM dei CD3 e Zeta da parte di chinasi della famiglia Src come Lck o Fyn (Lck si associa come vedremo successivamente al CD4 e CD8 , mentre Fyn è fisicamente legato al CD3)

Recettori per l'Antigene delle cellule T gamma-delta

E' un recettore eterodimerico per l'antigene che ha una struttura quasi identica al TCR solamente che non ha le catene alfa beta , ma le presenta gamma delta , che non vanno confuse con le gamma delta del complesso CD3 ; la maggioranza dei linfociti che lo esprimono non possiedono né CD4 né CD8 e complessivamente sono meno del 5% dei linfociti totali , ma si fanno di numero maggiore in zone specifiche come nell'intestino (mucosa dell'intestino tenue) dove raggiungono il 10% dei linfociti totali e vengono detti linfociti Intraepiteliali ; la caratteristica importante è che questi tipi di Linfociti hanno una diversificazione limitata , infatti non riconoscono l'antigene proteico associato all'MHC , ma riconoscono piccole molecole fosforilate come amine e lipidi (micobatteri e altri microrganismi) presentati da molecole MHC non convenzionali ; molti di questi linfociti gamma delta sono stimolati da proteine dello shock termico ; la limitata diversificazione del loro recettore , fa sì che non siano classificabili come cellule dell'Immunità specifica , ma che siano a metà tra questa e quella innata .

Recettori per l'antigene delle cellule NK-T

Esiste una sottopopolazione di linfociti T che esprime dei marcatori in comune con le cellule NK e questa viene chiamata **cellula NK-T** . Come le cellule gamma delta hanno una diversificazione limitata e nell'uomo sono caratterizzate da un unico riarrangiamento genico in Valpha24-Jalfa18 ; questo particolare tipo cellulare va a riconoscere lipidi e glicolipidi associati a strutture simili alle

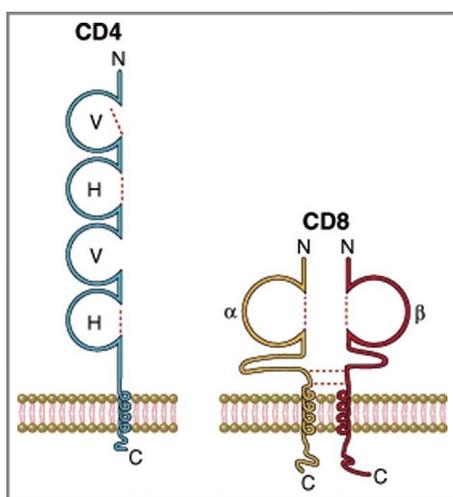
molecole MHC I e questi sono CD1 ; queste cellule dopo la stimolazione antigenica sono in grado di produrre citochine come IFN-gamma e IL-4 .

Corecettori e Recettori Costimolatori delle cellule T

I **Corecettori** sono una categoria di proteine di membrana che amplificano il segnale del TCR e il loro nome deriva dal fatto che questi condividono parzialmente i ligandi riconosciuti dal TCR .

I **Recettori Costimolatori** sono un gruppo di proteine che inviano segnali di attivazione alle cellule T e riconoscono le molecole costimolatorie espresse dalla APC .

CD4 e CD8 : corecettori coinvolti nell'attivazione dei linfociti T ristretta per MHC



CD4 e CD8 sono proteine di membrana che legano le regioni non polimorfe degli MHC , quindi andranno a legare il dominio Ig alfa3 per quanto riguarda l'MHC I quindi il CD8 (citotossico CTL) e il dominio Ig beta2 per quanto riguarda l'MHC II quindi il CD4 (helper) ; la loro funzione è quella di mediare la trasduzione del segnale (perchè sono associata labilmente a delle tirosine chinasi) o dei segnali che attivano i linfociti T , contribuendo anche a rafforzare il legame tra Linfocita T e APC .

Fanno parte della superfamiglia delle Ig visto che ne condividono il dominio Ig .

Il **CD4** è una glicoproteina transmembrana espressa dal Linfocita T periferico , dai timociti , da alcune cellule dendritiche e da alcuni fagociti mononucleati ; come struttura il CD4 è un monomero ed ha quattro domini Ig extracellulari , una regione transmembrana idrofobica e una regione citoplasmatica altamente basica di 38 aminoacidi ; con i suoi due domini Ig N-terminali andrà a legare la regione non polimorfa dell'MHC II quindi il dominio Ig beta2 .

Il **CD8** è un'altra proteina transmembrana espressa dai Linfociti come eterodimero , infatti ha due catene , una catena CD8alfa e una catena CD8beta che sono legate da ponti disolfuro ; tutte e due possiedono un dominio extracellulare Ig che andrà a legare il dominio non polimorfo dell'MHC I quindi il dominio Ig alfa3 ; alcuni linfociti esprimono CD8 in forma di omodimero , quindi con due catene alfa invece che alfa e beta .

L'espressione di CD4 o CD8 determina solamente la restrizione dell'MHC , ma non determina e non condiziona la capacità funzionale .

Il TCD4 e TCD8 partecipano agli eventi iniziali che si verificano durante l'attivazione del Linfocita T, infatti quando avviene il riconoscimento dell'antigene o meglio del complesso antigene-MHC, il recettore CD4-8 viene a trovarsi in una posizione più adiacente, più vicina fisicamente parlando al complesso TCR e porta contemporaneamente Lck in vicinanza dei residui di Tirosina del complesso TCR (sequenze ITAM) e le fosforila, dando così inizio alla cascata di attivazione dei Linfociti T. Queste Lck sono delle tirosine chinasi che sono associate a CD4/8

Inoltre, va aggiunto che il CD4 funge anche da recettore per il virus dell'HIV.

Recettori Costimolatori e Inibitori della famiglia del CD28

CD28 è una proteina recettoriale di membrana che riconosce le molecole costimolatorie espresse dalle APC che hanno riconosciuto l'antigene e così trasduce segnali complementari a quelli inviati dal complesso del TCR per l'attivazione dei linfociti T naive. I linfociti necessitano per l'attivazione di due segnali distinti e per questo si parla di ipotesi del doppio segnale; 1) il legame con l'antigene, che è responsabile della specificità della risposta e poi 2) l'attivazione delle molecole Costimolatorie.

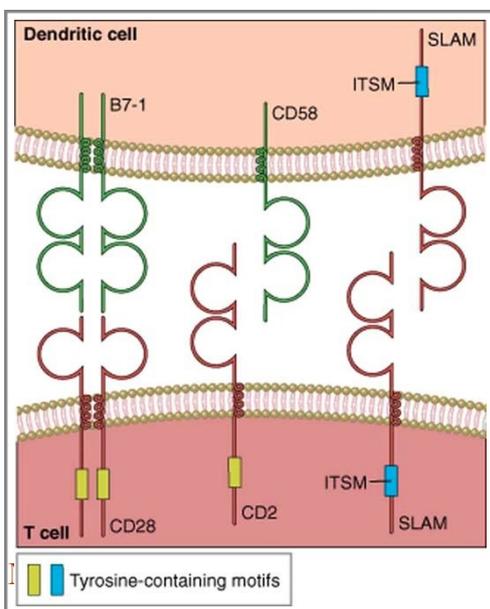
Per i linfociti T le molecole costimolatorie meglio conosciute sono una coppia di proteine correlate tra loro e sono **B7-1** (CD80) e **B7-2** (CD86) che sono espresse dalle APC, quindi macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B.

Per riconoscere queste molecole costimolatorie il linfocito T è dotato di un particolare recettore, la molecola CD28, che nell'uomo è espressa sul 90% dei linfociti TCD4+ e sul 50% dei linfociti TCD8+; questa proteina è un omodimero che è legato da ponti disolfuro, costituito da due catene dotate di un dominio Ig ciascuna; il legame con la molecola B7 induce l'espressione di proteine anti-apoptotiche, poi stimolano la produzione di fattori di crescita e di altre citochine, quindi promuovono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T; CD28 costituisce quindi il principale recettore che invia il secondo segnale al linfocito T per la sua attivazione, quindi attiva il linfocito T; in seguito è stato scoperto un secondo recettore che si chiama **CTLA-4** (CD152),

omologo a CD28, che viene espresso dai Linfociti TCD4+ e TCD8+ recentemente attivati e la sua funzione è esattamente opposta a CD28, quindi ha la funzione di inibire l'attivazione del linfocita T, quindi contrasta l'azione del CD28. Nonostante trasducano segnali opposti, riconoscono la stessa molecola.

CD2 e Recettori Costimolatori della famiglia SLAM

CD2 è una glicoproteina espressa da più del 90% degli T maturi, dal 70% dei timociti e dalle NK; contiene due domini Ig extracellulari, una regione idrofobica transmembrana e una lunga coda citoplasmatica di circa 116 aminoacidi. Nell'uomo il suo



principale ligando è una molecola chiamata **LFA-3** (CD58) della superfamiglia delle Ig , espressa sia come proteina integrale di membrana che come molecola ancorata alla membrana mediante un ponte di fosfatidilinositolo , sulle cellule emopoietiche .

Un sottogruppo di proteine della famiglia CD2 è il gruppo di proteine **SLAM** (molecola che segnala per l'attivazione dei linfociti) ; questa è una proteina integrale di membrana che contiene due domini Ig extracellulari e una coda citoplasmatica , la quale contiene un residuo ITSM (immunorecettore con motivo di attivazione basato sulla tirosina) , diverso da ITAM ; i domini Ig di SLAM sono coinvolti nelle interazioni omofile , infatti una SLAM riconosce un'altra SLAM quindi è espressa sia sull'APC che sul linfocita T ; inoltre il motivo ITSM lega un adattatore chiamato *SAP* (proteina associata a SLAM) che contiene un dominio SH2 e che fa da ponte tra SLAM e Fyn ; mutazioni di SAP sono la causa della patologia chiamata *XLP* , o sindrome linfoproliferativa associata al cromosoma X .

Altre molecole accessorie espresse dai Linfociti T

Esistono proteine che svolgono una funzione accessoria alle cellule T ; sono :

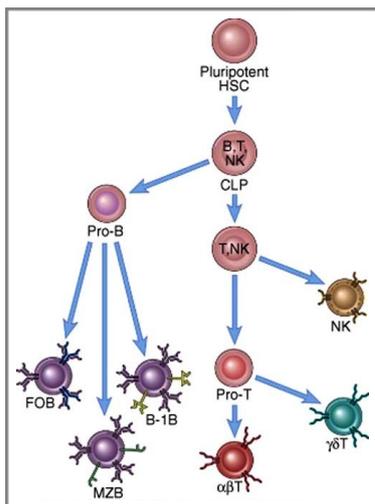
- 1) **CD44** : una glicoproteina acida di membrana ricca di gruppi solfato espressa in molti tipi cellulari , ma i linfociti T recentemente attivati ne esprimono una quantità maggiore rispetto ai naive ; questa lega l'Acido Ialuronico ed è quindi responsabile della ritenzione dei linfociti T nei tessuti extravascolari nei focolai di infezione ed è responsabile del legame dei linfociti T all'endotelio . Quando un linfocita T differenziato giunge nel focolaio di infezione e dopo la diapedesi riconosce l'antigene , viene stimolato ad esprimere delle molecole che lo trattengono in questa sede , così da consentirgli di svolgere la sua funzione effettrice . Tra queste ci sta CD44 .
- 2) Il **Ligando di CD40** : viene espressa dai linfociti TCD4+ attivati , una proteina trimerica della famiglia TNF che si lega ai CD40 espresso da APC e cellule endoteliali ; questo è un mediatore importante di molte funzioni effettrici dei linfociti T helper , perché andrà a stimolare macrofagi ad acquisire le capacità microbiche e i Linfociti B a proliferare e differenziarsi e tutto ciò che segue l'attivazione di un Linfocita B (capitolo 10) .
- 3) Il **Ligando per Fas** : viene espresso dai linfociti T e porta all'apoptosi della cellula bersaglio che presenterà il recettore Fas (CD95) .

Capitolo 8

Maturazione dei Linfociti , Riarrangiamento ed Espressione dei geni del Recettore per l'antigene

I Linfociti esprimono un recettore estremamente diversificato e tale diversificazione si attua durante il loro sviluppo , per poi migrare negli organi linfoidi secondari ed incontrare l'antigene per la loro attivazione e si trasformano in linfociti maturi ; il processo di trasformazione in maturi è detto sviluppo o **maturazione linfocitaria** ; l'insieme dei recettori per l'antigene e quindi delle specificità è chiamato **repertorio linfocitario** . (premessa : è un meccanismo complesso e l'aiuto delle slides potrebbe essere importante , in quanto sul libro alcune cose non sono state messe)

Caratteristiche generali della maturazione linfocitaria



Le cellule staminali emopoietiche HSC (Hematopoietic Stem Cells) maturano dando origine ai progenitori linfoidi comuni **CLP** (Common Lymphoid Progenitors) , che a loro volta danno origine a linfociti B , T , NK e altre cellule dendritiche . La maturazione dei Linfociti B comincia nel midollo osseo nell'adulto e nel fegato del feto , mentre i linfociti T dovranno subire un processo maturativo nel timo . Le cellule prodotte nel feto daranno origine a cellule B-1 e T-gamma-delta mentre nell'adulto la grande maggioranza saranno cellule B e cellule T-alfa-beta ; quindi possiamo dire che i Linfociti prodotti nel feto non avranno una grande diversificazione del repertorio recettoriale a differenza di quelli prodotti nell'adulto .

L'indirizzamento verso una linea differenziativa B o T viene indotta dai segnali ricevuti dal recettore di membrana , i quali spingono CLP a diventare o B o T ; è stato osservato come **IL-7** sia importantissimo per la maturazione del linfocito T e viene sintetizzata dalle cellule stromali del

midollo osseo e del timo ; una mutazione di IL-7 porta ad un'immunodeficienza chiamata immunodeficienza grave legata al cromosoma X , nella quale viene bloccata la maturazione dei linfociti T , mentre i linfociti B possono maturare anche in assenza di IL-7 .

Il **Riarrangiamento** dei geni è l'evento chiave della maturazione linfocitaria ; in ogni individuo possono esistere circa 10^{11} differenti cloni di Linfociti B o $10^{15/18}$ T ognuno dotato di un recettore specifico e se ogni catena del recettore dovesse corrispondere ad un gene del DNA , la maggior parte di questo sarebbe impegnata a codificare per il recettore per gli antigeni , infatti solamente una parte limitata andrà a codificare per le catene del recettore e saranno quei geni chiamati **funzionali** .

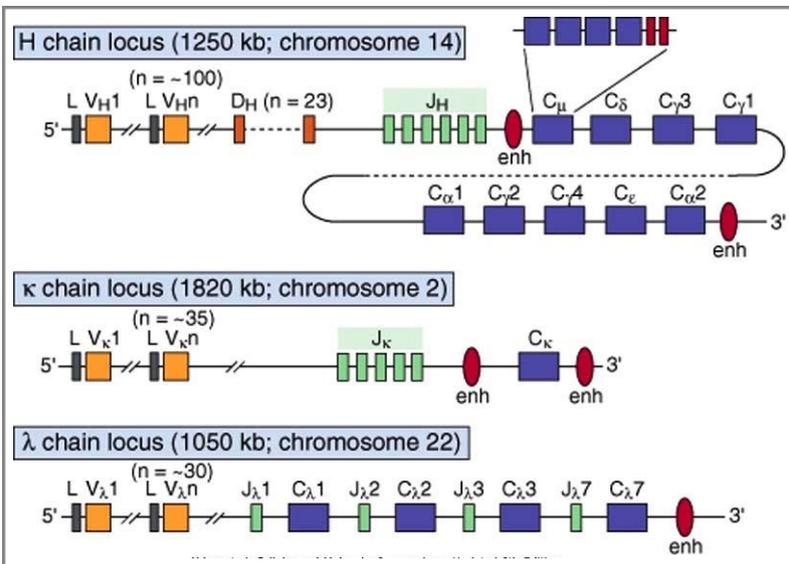
Prima che fosse possibile analizzare direttamente i geni delle Ig , si è cercato di spiegare tre caratteristiche della variabilità anticorpale :

- Lo stesso anticorpo ha una parte variabile e una costante
- Il Sito combinatorio è estremamente variabile
- Esistono diversi isotipi con la stessa specificità antigenica

Sono state proposte due teorie per spiegare l'origine della diversità anticorpale , la **teoria Germinale** secondo la quale esiste un gene per ogni catena Ig e il repertorio viene in gran parte ereditato e la seconda teoria , chiamata della **variabilità somatica** , secondo cui a partire da un numero limitato di geni vengono prodotte delle modificazioni durante la vita di un individuo ; a risolvere il problema sono stati gli esperimenti sulla clonazione dei geni per le Ig , che hanno rivelato come tutte e due le teorie siano corrette; infatti la sequenza di DNA codificante è ereditata , ma da un numero relativamente piccolo di segmenti genici originari e poi la diversificazione è aumentata da un processo di ipermutazione somatica che avviene nelle cellule B mature attivate .

In ogni singolo linfocita , uno dei molti geni che codificano per la regione variabile viene scelto a caso e coniugato a un segmento di DNA successivo , applicando tagli e ricongiunzioni alla doppia elica ; questo meccanismo andrà a ricongiungere parti terminali non omologhe , inoltre la diversificazione viene arricchita dall'aggiunta e dalla rimozione di singoli Nucleotidi all'interno della ricongiunzione dei vari segmenti , quindi una ricombinazione nella ricombinazione .

Il riarrangiamento avviene in forma corretta solamente in una cellula su tre ; durante la maturazione delle cellule B , il primo gene che viene riarrangiato completamente è il gene che codifica per la catena pesante della Ig , il gene IgH , mentre nei linfociti T-alfa-beta è il gene per la catena Beta quello espresso per primo ; una volta che il riarrangiamento è corretto per una di queste catene , può cominciare la sintesi della proteina e arriviamo all'espressione di un **pre-recettore** per l'antigene sulle cellule pre-B e pre-T ; ovviamente quei linfociti che non esprimeranno il pro-recettore in questa fase andranno a morire per apoptosi , e quindi , anche in assenza di antigene , il recettore o



meglio il pre-recettore già invia dei segnali di sopravvivenza alla cellula ; quei Linfociti che superano il controllo di qualità del pre-recettore , che viene ad essere testato con un antigene , allora potrà finire la maturazione ; questa tappa è la tappa della Selezione positiva o Selezione negativa . La **Selezione Positiva** è quel meccanismo che salvaguarda i linfociti utili ; ad esempio durante lo sviluppo dei Linfociti T , la selezione positiva assicura la

maturazione delle cellule che possiedono recettori che legano con bassa affinità antigeni self ; quindi la selezione positiva permette a quelle cellule coi recettori riarrangiati correttamente di sopravvivere . La **Selezione Negativa** invece è il processo che agisce all'inverso , infatti andrà a uccidere quei linfociti T che legano con alta avidità gli antigeni self attraverso la Delezione Clonale , mentre ai linfociti B viene data una ulteriore possibilità di salvarsi , infatti gli viene permesso un ulteriore riarrangiamento dei geni Ig al fine di modificare la loro reattività contro il self , in un processo chiamato Editing Recettoriale .

Riarrangiamento dei geni del recettore per l'antigene nei Linfociti B e T

I geni che codificano per i recettori per l'antigene dei linfociti B e T sono generati nei singoli linfociti dal riarrangiamento di segmenti diversi del gene che codifica per la regione variabile V con i segmenti della diversità D e i segmenti di ricongiunzione J ; per ognuno dei geni che codificano per il recettore , viene generato un esone riarrangiato mediante la fusione di queste tre regioni codificanti e il tutto avviene in modo casuale ; questo processo è chiamato **Ricombinazione V(D)J**

- Organizzazione dei loci genici per le Ig

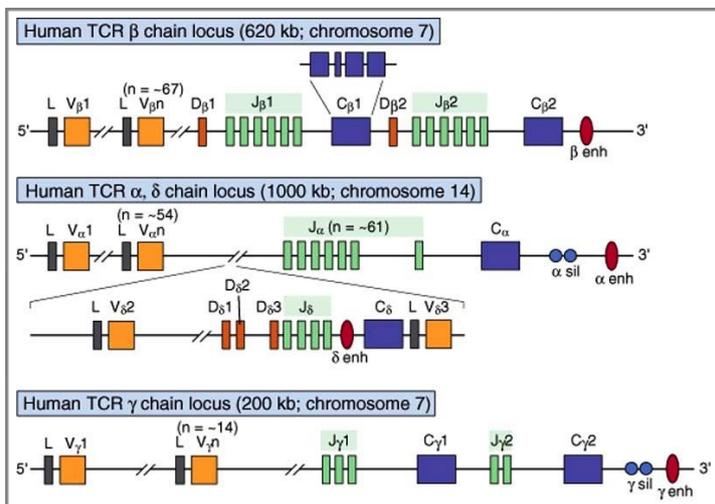
Esistono tre loci genici separati che codificano per tutte le catene pesanti , le catene leggere Kappa e Lambda ; ogni locus si trova su un diverso cromosoma , infatti vediamo che il locus per la catena pesante si trova nel cromosoma **14** , il locus per la catena leggera kappa sul cromosoma **2** e per la leggera lambda sul cromosoma **22** . Nella linea germinativa ciascun locus Ig è formato da copie multiple di due diversi segmenti , i segmenti V e J , più le regioni costanti C , mentre per quanto

riguarda la catena pesante dell' Ig (e non le catene leggere) esiste una regione D di diversità ; queste sequenze sono separate tra loro (almeno per adesso) da sequenze spaziatrici , non codificanti .

Catena	H	kappa	lambda
V	40	40	30
D	25	-	-
J	6	5	4
Cromosoma	14	2	22

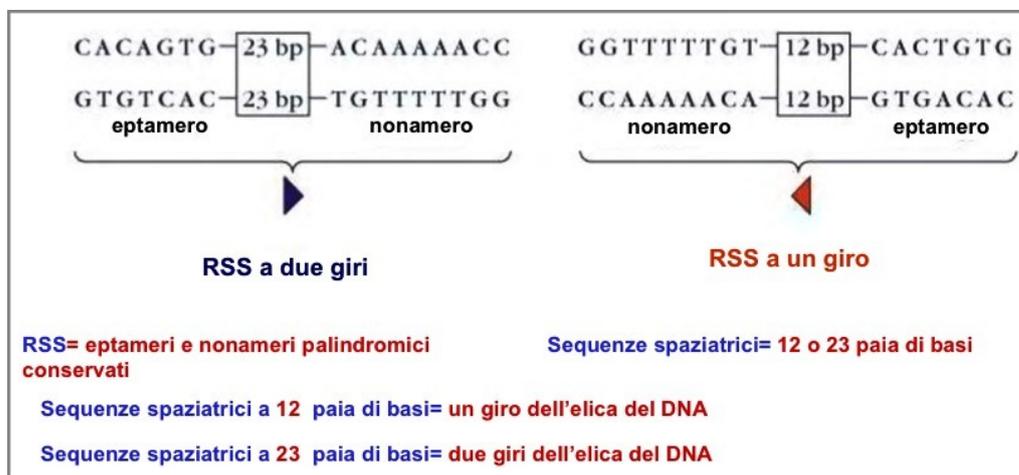
All'estremo 5' terminale di ciascun locus (pesante , leggera k , l) c'è un gruppo di **segmenti genici V** e al 5' di questi segmenti (ognuno) esiste una sequenza chiamata **sequenza leader** , la quale andrà a codificare nella proteina nascente 20-30 residui N-terminali moderatamente idrofobici identificati come peptide segnale , che avrà la funzione di guidare la traslocazione della proteina nascente dal citoplasma al reticolo endoplasmatico e una volta arrivati nel reticolo , questo peptide verrà rimosso dalla proteina nascente , infatti non lo ritroveremo nella proteina assemblata ; in posizione Upstream ad ogni esone leader troviamo un **promotore** del gene V che indicherà dove inizierà la trascrizione . A distanza variabile , vediamo in posizione 3' e in posizione Downstream rispetto ai segmenti V , dei **segmenti J** (che però staranno in posizione Upstream rispetto alle regioni costanti C , praticamente alla fine della catena) ; tra i geni V e J vediamo nel locus della catena pesante dei **segmenti D** , dei segmenti codificanti aggiunti .

Nelle catene leggere Kappa e Lambda , il dominio Variabile è codificato dai segmenti dei geni V e J , mentre nella catena pesante è codificata dai segmenti dei geni V , D e J ; ricordiamo che all'interno della regione variabile esistono tre regioni chiamate regioni Ipervariabili o regioni che determinano complementarietà CDR , e queste regioni avranno diversificazioni differenti , infatti la maggiore diversificazione è concentrata all'interno di CD3 e questa regione viene codificata dalle regioni V,D e J , mentre per CDR1 e CDR2 saranno codificate solo da V . Le sequenze non codificanti , introni , avranno un ruolo molto importante nella ricombinazione .



- Organizzazione dei loci del gene TCR

Il recettore TCR esiste in due forme , come più volte detto , il recettore alfa-beta e il recettore gamma-delta ; di conseguenza esistono 4 differenti catene , alfa, beta, gamma che avranno tre loci separati , mentre delta sarà contenuto all'interno del locus alfa . Il locs Alfa si ritrova nel cromosoma 14 , mentre i loci beta e gamma si ritrovano sul cromosoma 7 . Nella linea germinativa ciascun



locus contiene i segmenti V e J , mentre il segmento D sarà presente solo nelle catene beta e delta .

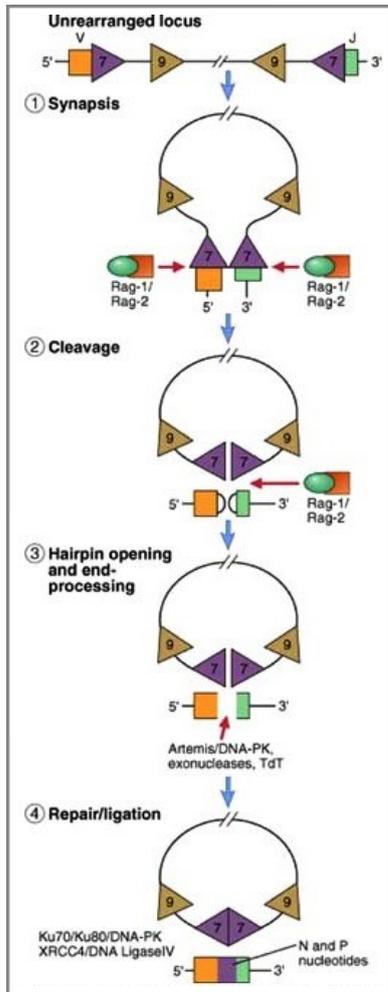
All'estremità 5' come per le Ig ritroviamo il gruppo di **segmenti genici V** , in posizione Upstream il peptide leader e ancora in Upstream il promotore ; all'estremo 3' terminale troviamo i segmenti genici C costanti , che nell'uomo sono 2 geni C in ciascuno dei loci beta e gamma e 1 gene C in ciascun locus per alfa e delta . I **segmenti J** si trovano immediatamente sopra i segmenti genici C e i **segmenti D** come già detto si ritrovano solamente in beta e delta , dove si ritrovano in upstream rispetto a J e in downstream rispetto a V .

	Alfa	Beta	Gamma	Delta
V	50	57	14	3
D	-	2	-	3
J	70	13	5	3
Costanti	1	2	2	1
Cromosoma	14	7	7	(14)

- Ricombinazione V(D)J

I geni in configurazione germinativa non vengono trascritti nell'mRNA che origina la proteina per il recettore per l'antigene ; il recettore per l'antigene si genera solamente nei Linfociti T e B in fase di maturazione mediante un riarrangiamento del DNA che rende contigui segmenti V,D e J scelti a caso . E' un processo che si svolge in più fasi e richiede la presenza di enzimi specifici che andranno a mediare il taglio della cromatina . Questo processo porterà l'RNA primario alla processazione affinché l'esone leader e la regione V,D,J siano contigue , per andare a formare quell'mRNA che può essere tradotto e produrre così una catena del corecettore per l'antigene . Tutto questo processo andrà a generare una enorme diversificazione .

Il riarrangiamento coinvolge segmenti non omologhi come detto prima ; I componenti dell'enzima principale di questo processo , ossia della Ricombinasi V(D)J (Rab-1 e Rab-2) , riconoscono alcune sequenze di DNA chiamate sequenze di segnalazione o **RSS** . Queste sequenze si trovano in dei



punti specifici , perché sono localizzate esclusivamente in posizione 3' del segmento V , all'estremo 5' del segmento J e agli estremi del segmento D (quando presente) ; queste sequenze sono altamente conservate e sono formate da 7 nucleotidi , o **eptamero** , di solito **CACAGTG** , seguita da sequenze spaziatrici o di 12 o di 23 nucleotidi non conservati corrispondenti o ad un giro o a due giri completi dell' elica del DNA , seguiti da un'altra sequenza conservata di 9 nucleotidi ricchi di AT , o **nonamero** . Gli intervalli di 12-23 nucleotidi portano il nonamero e l'eptamero in posizione tale da poter essere accessibili agli enzimi tramite la formazione di un anello cromosomale . La ricombinazione è eseguita come detto da enzimi specifici e si verifica tra due segmenti , soltanto se uno dei due segmenti è fiancheggiato da uno spaziatore di 12 nucleotidi e l'altro da uno spaziatore di 23 nucleotidi , o regola 12/23 , di conseguenza un segmento ricombinante di un giro ricombina sempre con un segmento di due giri . Il taglio avviene all'estremità 3' del segmento V e 5' del segmento J ; avviene prima il riarrangiamento D-J e poi questo esone viene unito al legamento V e ciò è permesso dal fatto che alle estremità di D sono presenti solo eptameri con sequenze spaziatrici di 12 .

Il processo di Ricombinazione vero e proprio si verifica in fasi distinte :

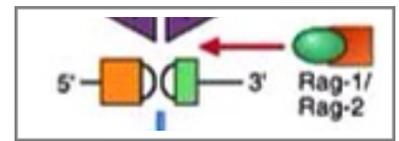
- 1) **Sinapsi** : Due determinati segmenti codificanti e le RSS adiacenti vengono in contatto grazie alla formazione di un anello sul cromosoma , o chromosomal looping , e sono mantenuti in questa posizione per i successivi eventi . Meccanismo mediato dalle due Ricombinasi (una per ogni segmento RSS) .
- 2) **Taglio** : mediante processo enzimatico si formano delle rotture del doppio filamento di DNA alle giunzioni RSS e sequenze codificanti (sempre le due Ricombinasi , che vanno a tagliare nelle giunzioni tra eptamero e sequenza codificante) . Si forma la forcina .
- 3) **Codifica e Processazione** : le estremità codificanti tagliate (ma non le RSS) vengono modificate dall'aggiunta e rimozione di basi , aumentando così la diversificazione (Artemis prima e TdT poi)
- 4) **Unione** : Le estremità codificanti tagliate e le estremità segnale si avvicinano e si uniscono mediante il processo di riparazione delle rotture del doppio filamento , o unione delle estremità non omologhe . (Ligasi IV)

Queste erano le 4 fasi , che vengono come già detto mediate da vari enzimi . Il ruolo più importante è quello dell'enzima **Ricombinasi V(D)J** un enzima formato da due proteine assemblate a formare

un tetramero , codificate da geni per le cellule linfoidi e sono il gene attivante per la **ricombinasi-1 Rag-1** e il gene attivante per la **ricombinasi-2 Rag-2** .

La proteina Rag-1 riconosce la sequenza di giunzione tra eptamero e sequenza codificante , legandola e tagliandola ; questa proteina è attiva solamente quando complessata assieme a Rag-2 in un tetramero , quindi formando l'enzima Ricombinasi . Questo si verifica su i due eptameri , quindi ci saranno due enzimi ricombinasi . Rag-2 invece va a legare altre proteine , chiamate fattori di accessibilità all'enzima e questi fattori sono chiamati così perché portano l'enzima in prossimità di quei loci aperti . L'enzima mantiene uniti i segmenti genici durante il ripiegamento del cromosoma o sinapsi e Rag-1 induce una rottura su una delle due eliche di DNA tra il DNA codificante e l'eptamero . Quel 3' OH rilasciato da questa rottura sul segmento codificante si attacca all'altro filamento formando con un legame covalente una struttura a forma

di forcina o hairpin (come si vede nell'immagine) , mentre l'altra estremità , incluso l'eptamero e il resto di RSS dà invece origine ad una terminazione o blunt a doppio filamento , che non viene

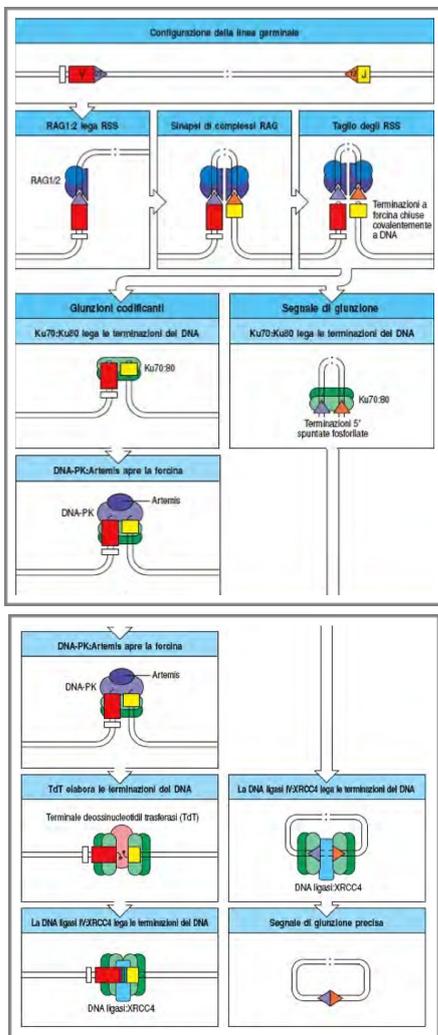


processato ulteriormente . Questa rottura del doppio filamento fa sì che l'hairpin chiusa di un segmento codificante si trovi di fronte all'hairpin chiusa dell'altra estremità codificante e che le due estremità si trovino l'una vicino all'altra . Come prima , Rag-1 e 2 mantengono unite le estremità hairpin e blunt prima che avvengano i processi di modificazione delle estremità codificanti e di unione .

Le hairpin devono essere modificate alle giunzioni codificanti con aggiunta o rimozione di basi al fine di accrescere ancora più la diversificazione del futuro recettore ; una volta avvenuta la modificazione , le estremità aperte possono essere unite correttamente , cioè estremità codificante con estremità codificante ed estremità segnale con estremità segnale .

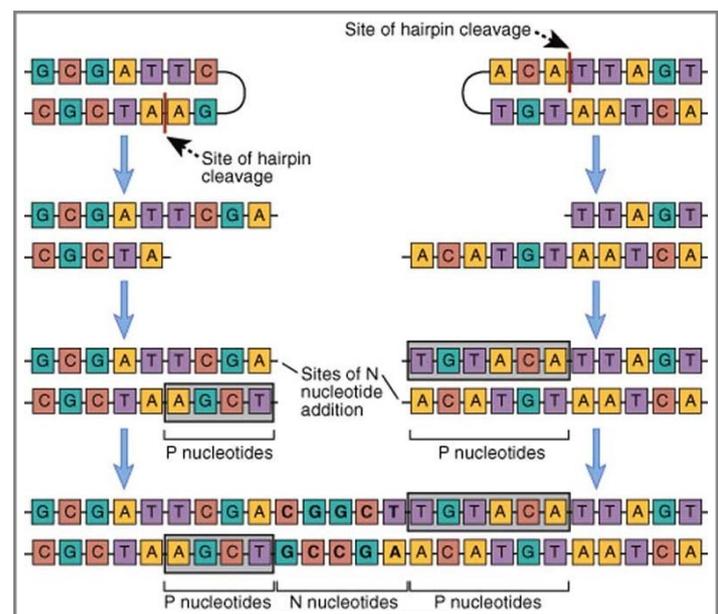
Topi privi di questo enzima fondamentale (TdT) , mancano di linfociti B e T maturi , perché questo enzima è cellulo-specifica e sono prodotte esclusivamente nelle linee differenziative B e T e i geni Rag sono espressi solamente nei Linfociti Immaturi ; perciò la ricombinazione avviene soltanto nei linfociti B e T immaturi e non in cellule mature ; inoltre i geni Rag sono espressi solamente nella fase G0 e G1 del ciclo cellulare e sono silenti nelle cellule in fase proliferativa , per minimizzare il rischio di rottura inappropriata del DNA durante la mitosi . Nel feto questo enzima non è espresso , per questo avremo dei recettori con diversificazione limitata .

Ricapitolando vediamo le ricombinasi (ognuna formate da Rag-1 e Rag-2) che riconoscono gli eptameri (RSS) e le legano . Vanno a ricongiungersi formando l'anello cromosomale che include i nonameri e le sequenze non codificanti (che verranno quindi delete - solo nella delezione-) . A questo punto avviene il taglio enzimatico da parte di Rag1 alla giunzione tra eptamero e sequenza codificante , così che vengono a formarsi due strutture separate e distinte . La prima conterrà la sequenza da eliminare e la seconda le sequenze da unire codificanti , che andranno a formare una struttura



chiamata hairpin o forcina . Il taglio è avvenuto solamente a livello di uno dei due filamenti del DNA e l'estremità 3' rilasciata andrà a formare questa forcina perché andrà sostanzialmente a ripiegare sul secondo filamento di DNA antiparallelo . A questo punto entra un secondo enzima , chiamato complesso **Ku70:Ku80** , che andrà a legare entrambe le strutture , quindi hairpin e sequenza da eliminare e andrà a reclutare degli enzimi per l'una e per l'altra struttura . Per le sequenze codificanti andrà a reclutare prima una **DNAPK** o Proteina Chinasi DNA dipendente che una volta fosforilata andrà a reclutare un secondo enzima o **Artemis** . Questo secondo enzima è fondamentale perché andrà ad effettuare un taglio a livello della forcina . Questo taglio è asimmetrico . Se si immagina il segmento codificante con la forcina come un lucchetto (corpo del lucchetto = sequenza e hairpin il segmento metallico) , vediamo che il taglio di Artemis non avviene a metà del segmento metallico , ma avviene all'inizio (giunzione corpo segmento) . E' come se si aprisse questo lucchetto e si viene a formare una sequenza palindromica , una sequenza stampo , perché questo segmento non è di ferro ovviamente , ma è un filamento del DNA , quindi sarà rilasciato e non avrà il corrispondente filamento , quindi avremo un filamento di DNA più

lungo dell'altro che dovrà essere riempito . Questo mancante viene formato tramite aggiunta di nucleotidi chiamati appunto P o palindromici e verranno aggiunti non casualmente , perché avranno uno stampo . Questo avviene su entrambe le sequenze , quindi avremo due file di segmenti nucleotidici P che vanno incontrandosi , ma non si incontrano , perché manca ancora una parte fondamentale per il legame ; quello che finora è avvenuto è un riempimento delle sequenze stampo . Affinché si leghino , il complesso Ku78:Ku80 andrà a reclutare un altro enzima , chiamato TdT o Terminal Desossinucleotidil Transferasi . Questo è l'enzima fondamentale della ricombinazione , perché andrà a portare la maggior parte delle modificazioni che garantiranno la diversificazione dei vari recettori , o Diversità Giunzionale . Andrà ad aggiungere quei nucleotidi chiamati N , che non avranno uno stampo e saranno completamente casuali . A questo punto Ku70:Ku80 andrà a



reclutare una Ligasi IV che andrà ad unire i segmenti . Ku70:Ku80 poi recluterà anche la Ligasi IV per chiudere ed unire le sequenze di DNA non codificante , o frammento "blunt" .

Si intende per **Diversità Combinatoria** il numero massimo di combinazioni possibili che un riarrangiamento può avere e dovrebbe essere nel giro delle migliaia , nonostante si potrebbe pensare che siano maggiori . Si parla invece di **Diversità Giunzionale** riferendosi al contributo che viene fornito alla diversificazione al momento della forma a forcina quando vengono inseriti all'interno della ricombinazione stessa nucleotidi casuali . Questi meccanismi però avranno anche un risvolto negativo , infatti aggiungere e rimuovere nucleotidi , fa sì che si verifichino degli slittamenti di lettura delle triplette e che si formino codoni di stop che bloccherebbero tutto quanto . Si forma un riarrangiamento corretto su tre . La DNA ligasi come precedentemente detto terminato il processo lega le estremità del DNA sia per le giunzioni codificanti , che per le terminazioni dei segnali di giunzione (7-9).

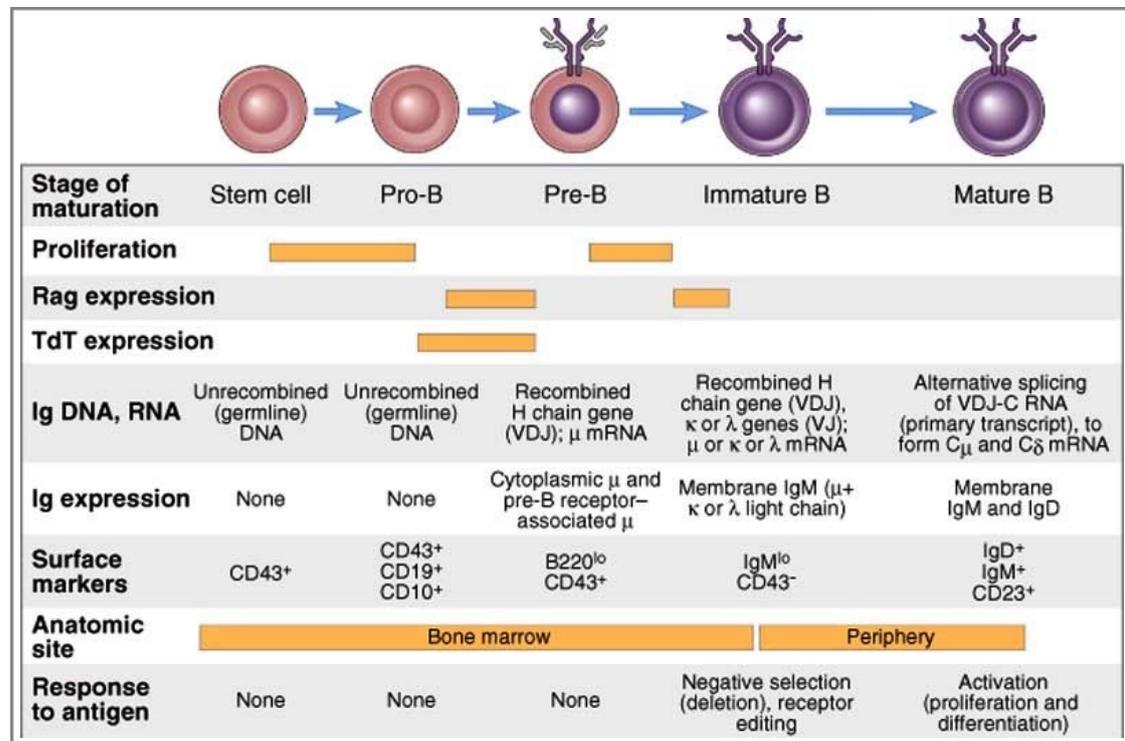
Solo una frazione del reale repertorio può essere espressa , come già detto e si calcola che un individuo possieda un numero nell'ordine di 10^7 di variabilità recettoriale , perché molti recettori prodotti probabilmente non superano la selezione .

Sviluppo dei Linfociti B

Nell'uomo lo sviluppo di un linfocita B maturo a partire da un precursore linfoide è di circa 2-3 giorni .

I Linfociti B si sviluppano nel fegato fetale e nel midollo osseo

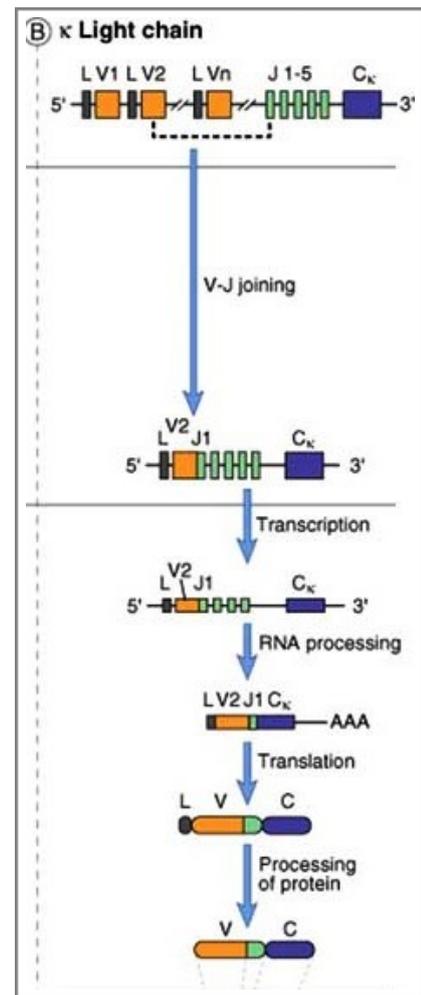
nell'adulto ; si parte dalla cellula staminale per arrivare al primo progenitore midollare orientato verso la linea differenziativa B , la **cellula pro-B** , le quali non producono Ig , ma possono essere distinte da altre cellule immature perché presentano sulla loro membrana CD10 e CD19 , le Rag



sono espresse in questa fase ed andranno a mediare la ricombinazione dei geni delle Ig e la prima ricombinazione avviene a carico del locus della catena pesante come precedentemente detto (ricordiamo che nella catena pesante abbiamo anche il segmento D) .

Le fasi si susseguono in questo modo :

- 1) Si avvicina un segmento D e si affaccia con uno J , con delezione del DNA interposto ; i segmenti esterni a questa regione di contatto , quindi quelli al 5' del D e al 3' del J non sono compresi in questo riarrangiamento .
- 2) Dopo la congiunzione di D-J , vediamo un segmento V affiancato a questa unità , per formare V-D-J e anche qui tutti i segmenti compresi tra i geni riarrangiati vengono rimossi (questa ricombinazione V con DJ è un evento critico perché solo il gene V riarrangiato viene successivamente trascritto) ; l'enzima TdT è presente in questa fase di pro-B quando si verifica la ricombinazione VDJ e poi la sua concentrazione si abbassa prima che la ricombinazione della catena leggera sia completa , quindi la diversità giunzionale attribuibile ai nucleotidi N nei geni riarrangiati delle catene pesanti è maggiore che nei geni delle catene leggere . Nel frattempo le regioni C costanti rimangono separate al 3' da questo segmento unito VDJ da una regione di DNA contenente il segmento distale di J e l' introne J-C .
- 3) Il gene riarrangiato per la catena pesante delle Ig è trascritto per produrre un trascritto primario che include il complesso VDJ riarrangiato e l'esone C_m(mì greca)
- 4) Vengono aggiunti dei residui poliadenilici , le code poli-a all'estremità 3' di C_m (mì)
- 5) L'RNA nucleare va incontro a splicing , che rimuove gli introni ed unisce gli esoni , dando così origine ad un mRNA giuntato (spliced) per la catena pesante m
- 6) A questo punto se la catena pesante ha avuto un riarrangiamento produttivo viene sintetizzata la proteina m



Per avere un riarrangiamento produttivo le basi alle giunzioni devono essere aggiunte o tolte in multipli di tre e si forma una proteina utile su tre (frequenza) .

Quando è avvenuto un riarrangiamento per Igm produttivo , la cellula non viene più identificata come cellula pro-B , ma **cellula pre-B** ; questa particolare cellula può esprimere Igm , ma ancora deve effettuare il riarrangiamento della catena leggera (che sia kappa o lambda) ; in questo stadio la Igm si associa a delle *catene leggere sostitutive* , chiamate Lambda5 e VpreB , omologhe a le catene leggere k e lambda , ma sono invarianti ; il complesso Igm associato alle catene invarianti e ad Ig alfa e Ig beta (svolgono le funzione di CD3) formano il recettore per la cellula pre-B o pre-BCR .

Per il passaggio da pro- a pre- sono coinvolte numerose molecole che si associano al pre-BCR , che permettono il controllo di qualità , come la **Btk** (tirosina-chinasi di Bruton) una chinasi necessaria per l'invio dei segnali di sopravvivenza della cellula , per la proliferazione e maturazione dei linfociti B e dei pre-B (mutazioni del gene BTK portano ad una patologia chiamata agammaglobulinemia legata al cromosoma X , caratterizzata dalla mancata maturazione del linfocita B) .

-Il pre-B regola l'ulteriore riarrangiamento dei geni delle Ig in due modi :

- 1) Se la ricombinazione della catena pesante riesce a produrre una catena utile in uno dei cromosomi , la catena pesante derivata dall'altro cromosoma viene inattivato , quindi uno solo dei cromosomi parentali viene utilizzato per riarrangiare la catena pesante , fenomeno chiamato **esclusione allelica** , che aiuta ad assicurare che ogni linfocita B esprima un solo recettore , mantenendo così la specificità clonale (se entrambi gli alleli producono catene pesanti non utili la cellula muore , ma se la prima ne produce una non utile allora viene utilizzata la seconda , se utile ovviamente)
- 2) Il secondo meccanismo con cui la pre-B controlla e regola la ricombinazione è la **stimolazione del riarrangiamento del gene della catena leggera** .

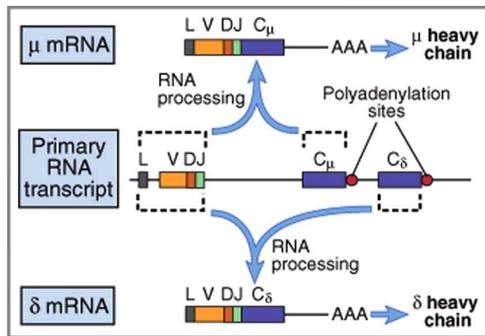
Nello stadio successivo la cellula pre-B passa a diventare una **cellula B immatura** , dove ogni cellula B immatura esprime una catena leggera , o kappa o lambda , ma mai tutte e due contemporaneamente , situazione chiamata **esclusione isotipica** , e viene assemblata prima la kappa in modo tale che se assemblata bene , la lambda non viene assemblata , quindi la produzione della catena kappa inibisce la produzione della catena lambda ; il locus della lambda subisce riarrangiamento solo ed esclusivamente se la kappa è riarrangiata non correttamente o se è indotta all'editing del recettore (la seconda possibilità - per modificare ulteriormente il riarrangiamento - cosa possibile solo per un B) ; come nel locus della catena pesante , la produzione di kappa e lambda è impedita dall'esclusione allelica e quindi vale solo per uno dei due cromosomi parentali .

Ricordiamo inoltre che il locus per kappa cromosoma 2 - locus per lambda cromosoma 22 ; e che non esistono segmenti D nei loci delle catene leggere , quindi si formerà solamente VJ .

La catena leggera prodotta andrà a complessarsi con la catena pesante prodotta per formare il recettore , assieme ad Ig alfa e Ig beta , dove funzionano come recettori specifici per gli antigeni .

A questo punto i linfociti B immaturi lasciano il midollo osseo per migrare nella milza e completare la loro maturazione prima di migrare verso gli organi linfoidi secondari .

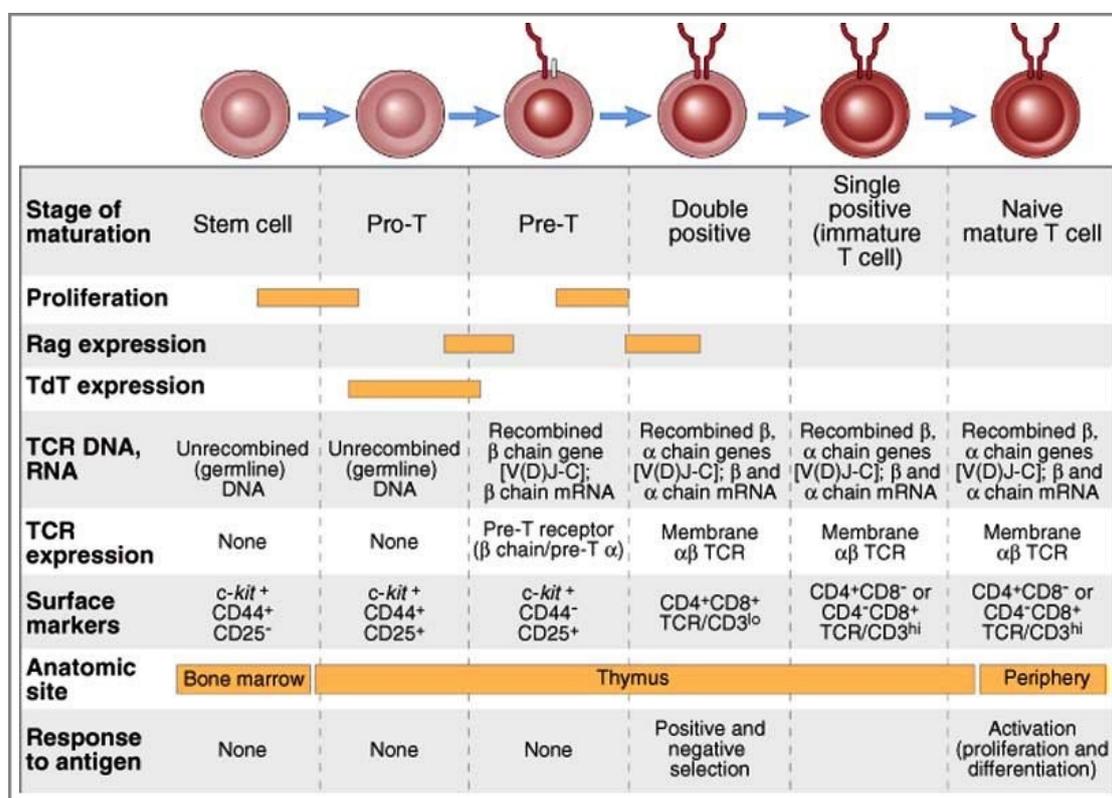
Molte delle cellule mature sono B follicolari che coesprimono le catene pesanti μ e delta in associazione alle catene leggere k/lambda e producono quindi sia IgM che IgD . Entrambe le classi



di Ig di membrana utilizzano lo stesso esone VDJ e si associano con catene identiche leggere ed è per questo che manterranno la stessa specificità anticorpale per l'antigene ; l'espressione simultanea in una stessa cellula dello stesso esone riarrangiato su due trascritti , uno che include Cdelta e uno che include Cmì , avviene per splicing alternativo dell'RNA quindi si origina un RNA m e uno delta ; lo splicing alternativo permette alla cellula di produrre simultaneamente mRNA maturo e due diversi isotipi di catena pesante , inoltre la coespressione di IgM e IgD è

accompagnata dall'acquisizione della competenza funzionale e della capacità di ricircolare e questa è la ragione per la quale le cellule follicolari sono chiamate anche cellule B mature . Le cellule B follicolari andranno ad occupare delle aree ben definite negli organi linfoidi (follicoli delle cellule B) e rimangono in tali sedi perché viene espresso un segnale da un ligando con funzione trofica **Baff** della famiglia del TNF .

Solo però il Linfociti B dotati di Ig di membrana funzionali andranno a ricevere i segnali necessari per la loro sopravvivenza dal BCR ; i Linfociti B immaturi che riconoscono peptidi self avranno come già detto una seconda chance di cambiare la propria specificità attraverso l'editing recettoriale ; durante questo processo vediamo una riattivazione dei geni Rag , quindi un nuovo riarrangiamento VJ (nelle leggere non abbiamo D) e alla produzione della nuova catena leggera non self reattiva ; purtroppo però spesso vediamo che il riarrangiamento interessa geni autoreattivi della catena k . Una volta però diventati maturi IgD⁺ e IgM⁺ potranno riconoscere l'antigene (esclusivamente in forma nativa , non processata su MHC) , proliferare e differenziare .Esiste inoltre una seconda sottopopolazione di linfociti B , che originano dalle cellule staminali ematopoietiche del fegato fetale ed esprimono la molecola CD5 e che nell' adulto rimangono all'interno del peritoneo e nelle mucose in continuo auto-rinnovamento . Sono i **Linfociti B-1** che avranno come i linfociti T gamma delta una diversificazione limitata (TdT non è espressa nel fegato) ; queste cellule secernono spontaneamente quegli anticorpi chiamati naturali perché presenti negli individui senza un'evidente immunizzazione nella flora intestinale .Ci sono poi altre cellule B , quelle **della zona marginale** della milza , simili alle B-1 per la limitata diversificazione , con la capacità di rispondere agli antigeni polisaccaridici e produrre anticorpi naturali esprimendo IgM di membrana e la molecola CD21e possono differenziarsi in plasmacellule a vita breve che secernono IgM .



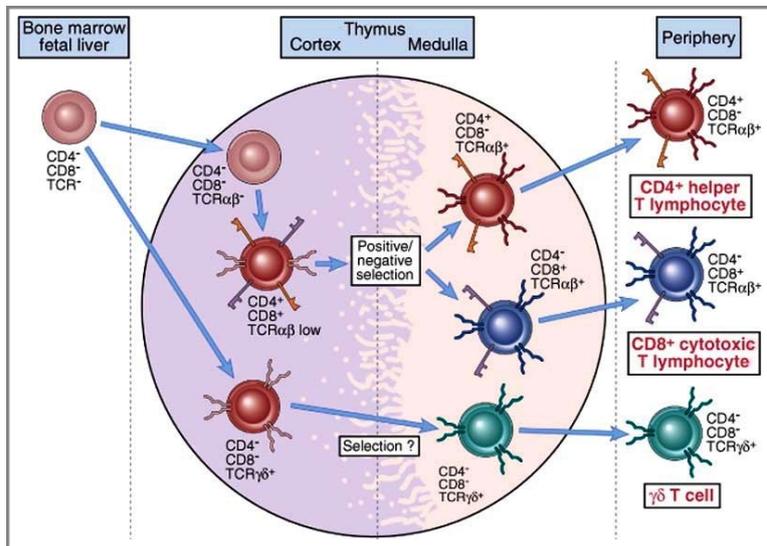
Maturazione dei Linfociti T

Il Timo è la sede di maturazione principale dei linfociti T, da cui deriva il nome infatti (timo-dipendenti).

La mancanza del timo è associata ad una patologia chiamata Sindrome di DiGeorge, che si associa a un basso numero di linfociti T maturi e quindi un deficit nella risposta mediata dai linfociti T.

Quest'organo è soggetto ad una involuzione con l'età, infatti in proporzione alla nascita è un organo dotato di una buona dimensione, mentre nell'adulto rimane come ammasso di tessuto adiposo; questo perché i linfociti T di memoria hanno una lunga emivita e quindi non devono essere rinnovati necessariamente e quindi si accumulano.

I linfociti T originano da precursori linfoidi nel fegato fetale (8a settimana di gestazione) e nel midollo osseo di un individuo adulto, per migrare sin da subito all'interno del Timo, dove compiranno la loro maturazione funzionale e morfologica; le cellule in maturazione nel Timo saranno chiamate **timociti** e le prime che arrivano, quindi quelle più immature non esprimeranno ovviamente il TCR e neanche CD4 e CD8; sono localizzati inizialmente nella regione sottocapsulare per migrare durante la maturazione verso la corticale dove avrà luogo la maggior parte della maturazione (quando usciranno da qui i linfociti saranno dotati del TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$), per poi passare nella midollare dove incontreranno cellule dendritiche e cellule epiteliali del timo fondamentali per la loro maturazione e poi usciranno dal timo nel torrente ematico in grado di riconoscere l'antigene. Possono esistere $10^{15}/18$ cloni di linfociti T con TCR differenti!



L'ambiente timico è fondamentale per la loro maturazione, in quanto permetterà al linfocito di incontrare numerose molecole espresse all'interno del corpo umano e di tutti i tessuti, in modo tale da verificare la loro efficienza, quindi nel timo compiono un vero e proprio addestramento; all'interno della corticale le cellule epiteliali timiche andranno a formare con i loro prolungamenti un reticolo, attraverso il quale dovranno passare i timociti, per poi incontrare nella regione midollare cellule

dendritiche nelle giunzioni cortico-midollari e i macrofagi nella regione midollare vera e propria (queste cellule, ripetiamo, sono fondamentali per l'addestramento).

Per la maturazione dei linfociti T sono fondamentali due tipi di molecole prodotte dalle cellule timiche di tipo non linfoide:

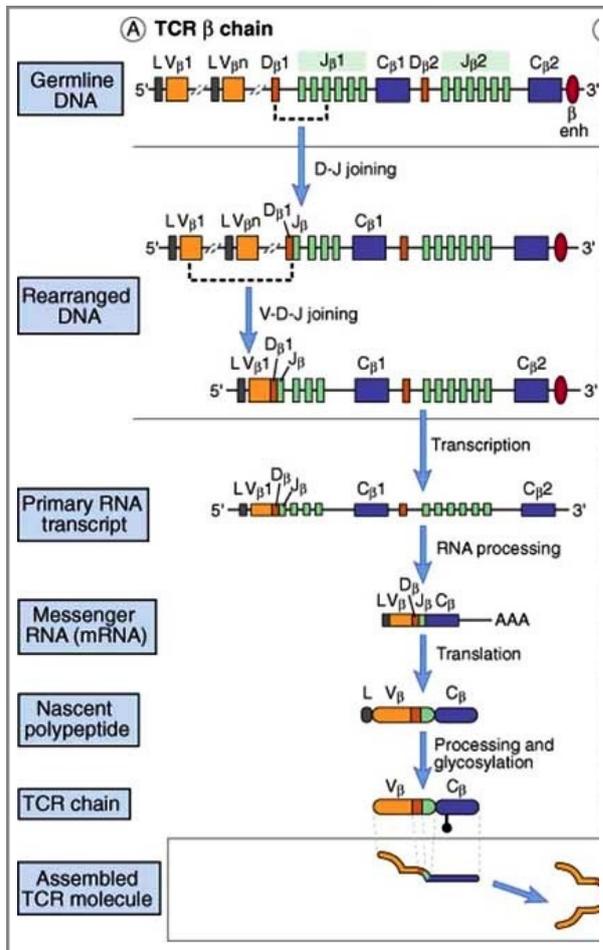
- 1) Le MHC I e II che vengono espresse dalle cellule epiteliali e dalle cellule dendritiche, che saranno fondamentali nel corso della maturazione
- 2) Le citochine e le chemochine espresse sempre dalle cellule stromali ed epiteliali del timo; la più importante per la maturazione dei linfociti T è senz'altro l'interleuchina-7 **IL-7**, fattore di crescita linfopoietico e poi le chemochine CCL19 e CCL21 per le quali avranno il recettore CR7, che saranno le molecole che mediano la loro migrazione.

Il grado di proliferazione e di apoptosi nel timo è molto alto ed ogni precursore darà origine ad un'ampia progenie, di cui però il 95% è destinata a perire, per la combinazione cruciale dell'incapacità di generare una catena beta del TCR associata alla selezione positiva/negativa, tappa fondamentale del processo maturativo dei linfociti T

- Stadi della maturazione dei Linfociti T

Come già detto i timociti immaturi non esprimono alcuna molecola, quindi né TCR, CD3, Zeta, CD4 o 8, niente di tutto questo e perciò vengono definiti **timociti doppio-negativi** e si identificano nello stadio cellulare **pro-T**. Qui avverrà il primo riarrangiamento genico, che somiglia a quello che si verifica per il BCR ed è qui che verranno espressi alti livelli di Rag, necessarie per il riarrangiamento genico. Si comincia con la catena Beta. Al termine del riarrangiamento, con la proteina espressa avrà cambiato stadio.

- 1) La prima tappa è l'unione dei segmenti D e J beta [ci sono due segmenti D (1-2) e sei segmenti J (1-6)], quindi questo è il primo riarrangiamento



- 2) La seconda tappa vede l'unione del segmento V (infiniti) all'esone DJ .
- 3) Segue poi la rimozione degli introni interposti , quelle sequenze di DNA non codificante , con giunzione delle sequenze delle regioni costanti C (1-2)
- 4) Aggiunta della coda poli-a AAA che servirà per il salvataggio da una prematura degradazione delle esonucleasi
- 5) Traduzione dell'mRNA che porta ad una proteina completa Beta

A questo punto se il riarrangiamento è avvenuto correttamente ("in frame") allora la catena Beta può disporsi sulla superficie del **pre-T** assieme ad una catena invariante **pre-T-alfa** che andrà a sostituire temporaneamente la catena alfa (TCR ha alfa e beta) , per formare il recettore pre-T ; il riarrangiamento corretto come per i linfociti B avviene in una cellula su tre

(frequenza) .

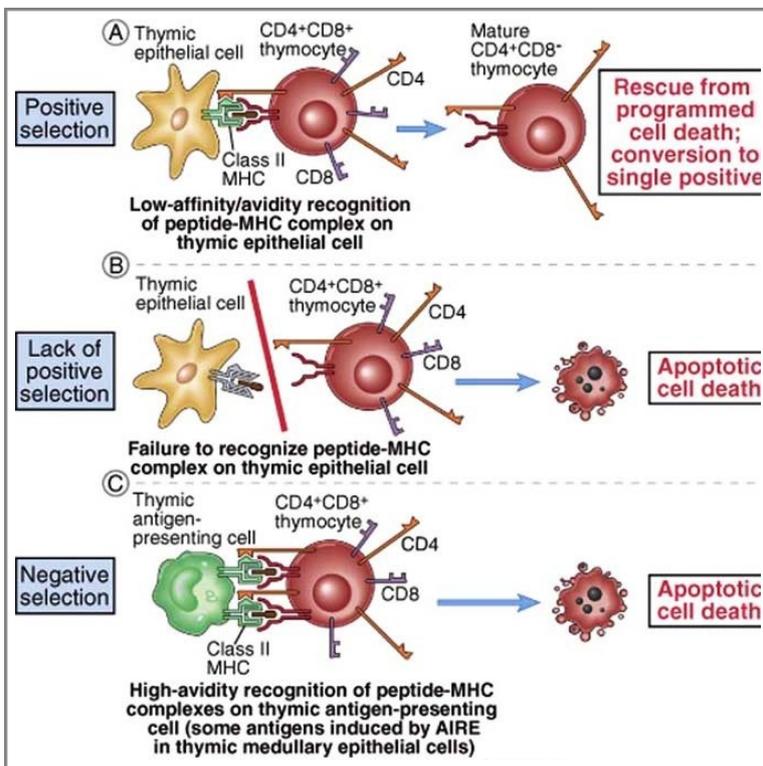
A questo punto saranno fondamentali i segnali inviati dal TCR alla cellula , per la propria sopravvivenza e maturazione , perché questi faranno iniziare la ricombinazione del locus della catena alfa ; questi segnali inibiscono un ulteriore riarrangiamento della catena beta , quindi ci troviamo di fronte all'esclusione allelica del locus beta ; la trasmissione dei segnali non è antigene dipendente , ma dipende fortemente dal corretto assemblaggio del pre-TCR .

Allo stadio successivo vediamo i timociti **doppio-positivi** , che esprimeranno CCR7 (che medierà la loro migrazione nella midollare , dove troveranno le famose cellule responsabili dell'espressione delle MHC) ed esprimono CD4 sia CD8 (essenziale questo punto) ; si verifica il riarrangiamento della catena alfa , concomitante all'espressione tardiva di Rag (la sua espressione era diminuita dopo aver riarrangiato la catena beta , mentre viene riespresso per l'assemblaggio della catena alfa) .

L'assemblaggio della catena alfa è più semplice della catena beta , visto che non sono presenti i segmenti D nel locus del TCR alfa , e quindi il riarrangiamento consiste nell'unione dei segmenti V (molti) e i segmenti J (circa 53) che saranno molti quindi consentiranno molteplici interazioni , tentativi multipli di riarrangiamento , aumentando di fatto la probabilità di ottenere un riarrangiamento corretto ; l'esclusione allelica per la catena alfa è scarsa o addirittura nulla , quindi sulla superficie cellulare di quel linfocito verranno coespressi due tipi di recettori , ma il secondo

prodotto sembra non avere alcuna funzione (fino al 30% dei linfociti T esprime la stessa catena beta e catene alfa differenti) ; come per la catena beta sono presenti dei promotori all'estremità 5' che durante il processo di riarrangiamento vengono a trovarsi in prossimità degli enhancer al 3' i quali andranno a potenziare gli effetti della trascrizione . L'espressione del gene TCR alfa porta la cellula quindi all'espressione del TCR alfa beta completo , associato ovviamente al CD3 e alla catena Zeta ; c'è da notare che il riarrangiamento della catena alfa porterà la delezione o comunque la rimozione dei segmenti intronici , ma ricordiamo che all'interno del locus alfa è contenuto il segmento per delta (del recettore gamma-delta) , perché condividono lo stesso locus sullo stesso cromosoma (14) e di conseguenza questa cellula non potrà più diventare un Tgamma-delta .

La prima cellula ad esprimere alfa-beta è quella che si trova nella corticale del timo e che si appresta ad entrare nella midollare per testare le sue capacità e per passare la tappa più difficile , quella che riguarda la **Selettività** Positiva e Negativa . In questo stadio le cellule passano a **timociti singolo-positivo** T CD4+ o T CD8+ .



La Selezione Positiva promuove la sopravvivenza selettiva e l'espansione dei timociti con il TCR ristretto per MHC self . (determina la restrizione) E' il processo in cui i linfociti che legano con media avidità gli MHC-Ag self espresse dalle cellule epitelio-reticolari vengono salvati (nel vero senso della parola) , sono stimolati anzi a sopravvivere . Quei linfociti invece che non riconoscono il self , sono indotti a morire per apoptosi ; sarà questo ad assicurare che i linfociti T che maturano siano ristretti per gli MHC self . Ogni cellula inoltre che non riconoscerà un MHC con peptide morirà . Durante la transizione a doppia positività a cellule a singola positività , i timociti con TCR ristretti per classe I divengono CD8+CD4- ,

mentre quelli ristretti per classe II divengono CD4+CD8- (che fungeranno da corecettori per l'MHC andando a legare nella alfa 3 MHC I e beta 2 MHC II) . I peptidi legati sulle MHC svolgono un ruolo fondamentale nella selezione positiva ; il timo non può ovviamente contenere tutti gli antigeni che un individuo nel corso della propria vita riconoscerà o potrebbe riconoscere , però può mostrare ai linfociti T in via di maturazione quali peptidi self vengono espressi in tutti i tessuti , quindi i peptidi estranei non sono coinvolti nella selettività positiva e quindi la selezione positiva si basa sul riconoscimento del self .

Il fatto che il linfocito leghi un MHC con bassa avidità non è ancora stato spiegato bene , nel senso il fatto che un linfocita riconosca , seppur a bassa affinità , il self potrebbe essere dannoso e potrebbe scatenare risposte autoimmuni , però per attivare una risposta da parte dei linfociti T è necessario che il legame sia abbastanza elevato da essere attivato per generare risposte immuni .

La **Selezione Negativa** è quel processo attraverso cui vengono eliminati per apoptosi i timociti che riconoscono il complesso MHC-Ag self , espressi dalle cellule dendritiche e dai macrofagi , con grande avidità di legame .

La tolleranza indotta dal riconoscimento di antigeni self negli organi linfoidi primari (o centrali) da parte di linfociti immaturi viene detta tolleranza centrale , per distinguerla dalla tolleranza periferica , che invece viene esercitata dai linfociti maturi in risposta agli antigeni self presenti nei tessuti periferici .

La restrizione MHC viene assegnata o attraverso il riconoscimento delle MHC attraverso il modello "istruttivo" , oppure attraverso il modello "stocastico" , un processo casuale che se genera linfociti T ristretti per MHC I o MHC II che non riconoscono l'antigene legato , questi vengono uccisi per apoptosi .

La selezione negativa può avvenire alle doppio positive e alle singolo positive ; le cellule T doppio positive sono attratte nella midollare dalle chemochine CCL21 e CCL19 per le quali hanno CCR7 , dove verrà espressa una proteina nucleare chiamata **AIRE** (regolatore autoimmune) importantissima , che induce nel timo l'espressione di numerosi geni tessuto-specifici . Questo rende disponibile , durante la selezione negativa delle cellule T doppio positive e singolo positive , quei peptidi che normalmente sono espressi in tutti i tessuti e che quindi incontreranno sicuramente nella loro emivita ; una mutazione di AIRE porta ad una sindrome poliendocrina autoimmune . inoltre ovviamente saranno espressi quei peptidi self del timo e anche peptidi self ubiquitari , che sono comuni in molti tessuti .

Il fattore chiave di queste due selettività è quindi senza dubbio la forza del riconoscimento antigenico

- Linfociti T gamma delta : è sensibilmente differente al TCR alfa beta per quanto riguarda la capacità di rispondere agli antigeni , in quando questi possiedono una capacità molto limitata , una diversificazione limitata come i linfociti B-1 ; sono quindi due linee differenziative che si escludono a vicenda .

- Cellule NK-T : sono una sottopopolazione di linfociti T . Possiedono dei marcatori di superficie in comune con le NK e non sono ristretti per MHC e non riconoscono peptidi presentati dalle APC ; riconoscono però antigeni lipidici e glicolipidici espressi sulle CD1(molecola simil-MHC I) ; non esprimono CCR7 e non migrano nella midollare ma sono abbondantemente espressi nel fegato .

Capitolo 9

Attivazione dei Linfociti T

Caratteristiche Generali dell'Attivazione dei linfociti T

I linfociti T naive si concentrano all'interno degli organi linfoidi nelle aree T dove incontreranno le APC con l'antigene legato all'MHC per attivare la risposta ; l'attivazione dei linfociti T avviene in seguito al riconoscimento dell'antigene e porta all'espansione di quel clone linfocitario e al differenziamento in cellule effettrici e di memoria .

La cellula dendritica riconosce l'antigene attraverso i propri recettori (Toll Like) e si attiva , cominciando ad esprimere delle molecole costimolatorie , B7 (1 e 2) , maturano e migrano negli organi linfoidi secondari , dove è massima la probabilità di incontrare il linfocito T specifico , attratti dalle chemochine espresse nelle aree T , 19 e 21 . Arrivate a contatto con il linfocita , questo per essere attivato ha bisogno come già detto di due segnali (ipotesi del doppio segnale) un primo segnale che è il riconoscimento dell'antigene (responsabile della specificità della risposta) e un secondo segnale dettato dal riconoscimento delle molecole costimolatorie espresse dalle APC (espresse in conseguenza della cattura dell'antigene) . Questi due segnali portano all'attivazione del linfocita T . Il linfocita T attivato a sua volta comincia a produrre delle citochine come IL-2 (autocrina) per la propria stimolazione , che determinerà l'espansione clonale (di quel clone , o meglio di quei linfociti T attivati dall'antigene) ; IL-2 assieme ad altre citochine stimola anche il differenziamento dei linfociti in cellule effettrici e di memoria .

Linfociti T attivati possono diventare cellule effettrici : alcuni diventano linfociti TCD4+ i quali potranno uscire dall'organo linfoide secondario e migrare nel sito di infezione dove potenzieranno l'azione microbica dei macrofagi , attiveranno i macrofagi (help) allo scopo di eliminare i microrganismi fagocitati ; alcuni CD4+ invece rimarranno negli organi linfoidi secondari dove potranno aiutare i linfociti B a diventare plasmacellule e a produrre anticorpi ; i linfociti TCD8+ invece migreranno nei siti di infezione per uccidere le cellule infettate da patogeni intracellulari , tumorali e virali .

Alcuni linfociti durante l'espansione clonale vengono messi da parte come cellule di memoria , che serviranno in una infezione secondaria e saranno importantissimi .

Le risposte scemano mano a mano che l'antigene viene eliminato e le cellule T muoiono apoptoticamente perché non hanno più motivo di esistere e quindi si ristabilisce il numero originale dei linfociti T per l'omeostasi del sistema immunitario . Sopravvivono solamente le cellule di memoria .

Attivazione dei Linfociti T CD4+

L'attivazione dei CD4+ richiede il riconoscimento dell'antigene e le molecole costimolatorie (le molecole costimolatorie sono fondamentali , così come anche le citochine , perché saranno queste a indurre una via differenziativa piuttosto che un'altra) . I linfociti CD4+ naive si localizzano negli organi linfoidi secondari come detto e possono uscire e rientrarci , quindi entrare nel circolo sanguigno ed uscirne , nel processo chiamato ricircolazione linfocitaria che rende massima la possibilità di trovare l'antigene .

Le risposte dei linfociti TCD4+ sono indotte dal riconoscimento dell'antigene di origine extracellulare caricato su un MHC II , oppure nel caso delle vaccinazioni , da antigeni solubili che sono somministrati in associazione a sostanze adiuvanti e vengono catturati dalle cellule dendritiche . Questi antigeni che sia di origine extracellulare o solubile viene internalizzato nelle vescicole e caricato sulle MHC II .

In seguito al riconoscimento di questo antigene , le DC esprimono alti livelli di B7-1 e B7-2 che forniscono il segnale necessario al linfocito per attivarsi e poi producono una citochina importante per la differenziazione di quel linfocito , la IL-12 .

La proliferazione del linfocito T è dovuta principalmente però all' IL-2 prodotta dal linfocito stesso in conseguenza del riconoscimento delle molecole costimolatorie e dell'antigene ; producono questo fattore di crescita e producono anche il recettore per lo stesso , questo è un tipo di stimolazione autocrina ; solamente i Linfociti T antigene specifici prolifereranno . Tutto questo porta all'espansione clonale .

Il numero dei linfociti circolanti , specifici per quell'antigene , prima dell'espansione si aggira intorno ad 1 su 10^6 , mentre dopo l'espansione clonale questo numero arriva ad 1 su 100 o 1000 quindi un aumento di mille volte , tuttavia la maggior parte muore per apoptosi dopo la risoluzione dell'infezione .

Attivazione dei Linfociti T CD8+

Avviene in seguito al riconoscimento dell'antigene e alle molecole costimolatorie come sempre , ma differisce dall'attivazione CD4 per alcune particolarità .

Antigeni intracellulari (microbi intracellulari , virus o tumori) delle APC vengono caricati sulle MHC I e presentati ai linfociti CD8+ . Alcuni tessuti e cellule infette o trasformate , esprimono l'antigene ma non esprimono molecole costimolatorie quindi per attivare la risposta del CD8+ c'è necessità del secondo segnale . Per questo motivo le cellule dendritiche (DC) hanno la capacità di fagocitare cellule infette , ma queste cellule infette dovranno essere processate e quindi potrebbero essere associate alla via di processazione esogena , la stessa delle MHC II , ma i CD8+ riconoscono solo MHC I . La natura del perché questi antigeni non rientrino in questa via è sconosciuta , ma sta di fatto che questi antigeni vengono caricati su MHC I pur essendo di origine extracellulare e quindi potranno essere riconosciute dai CD8+ . Questo tipo di presentazione viene detta **cross-presentation** o cross-priming per indicare che una certa cellula (APC) può presentare antigeni che derivano da un'altra cellula ai linfociti T CD8+ . Questa è una caratteristica esclusiva ed unica delle cellule dendritiche che quindi possono presentare antigeni a T CD8+ .

L'attivazione completa dei linfociti T naive viene facilitata dai linfociti T CD4+ o helper .

Esperimenti hanno evidenziato come questa sia molto importante , infatti questi forniscono il secondo segnale ai CD8+ , ma questo aiuto varia a seconda della condizione della risposta , infatti una risposta molto forte , in cui è infettata direttamente una APC vediamo che il coinvolgimento dei CD4+ può essere superfluo , mentre in una risposta verso infezioni virali latenti , o tumori , organi trapiantati , che provocano una blanda attivazione dell'immunità innata , la costimolazione dei CD4+ è fondamentale .

I Linfociti T CD4+ helper possono promuovere l'attivazione dei CD8+ attraverso un meccanismo : questi quando vengono stimolati esprimono una proteina , il **ligando per CD40** per il quale le cellule dendritiche hanno il recettore **CD40** ; questa interazione potenzia la capacità delle APC di indurre differenziazione nei CD8+ .

L'espansione clonale del clone linfocitario è più netta rispetto a quella dei CD4+ se per questi infatti avevamo un aumento di frequenza da 1 su 10^6 a 1 su 100 o 1000 quindi di 100000 volte , per i CD8+ avremo che la frequenza sarà di 1 su 10! Quindi l'espansione antigenica per i CD4+ è molto più modesta ; molte citochine agiscono da fattore di crescita e da stimolazione per l'espansione , come IL-12 , -15 e -7 .

I CD8+ naive quando vengono attivati (riconoscimento dell'antigene e rilascio di IL-12) acquisiscono quelle capacità proprie per l'eliminazione della cellula bersaglio , diventano CTL : i granuli contenuti al loro interno si sviluppano notevolmente e questi contengono la *perforina* e il *granzima* ; inoltre

producono citochine come TNF , IFN-gamma e la linfotossina che attivano le cellule fagocitarie e promuovono la risposta infiammatoria .

Ruolo delle molecole costimolatorie nell'attivazione dei Linfociti T

Le molecole costimolatorie come ampiamente detto rappresentano il secondo segnale per l'attivazione dei Linfociti T ; viene chiamata costimolazione perché agisce in associazione all'antigene

In assenza di costimolazione , i Linfociti vanno incontro a morte apoptotica oppure entrano in uno stato chiamato anergia , dovuto alla mancata responsività ad una stimolazione antigenica .

La via di costimolazione meglio conosciuta finora è quella rappresentata dall'interazione tra CD28 espresso dai linfociti T come recettore di membrana e le molecole costimolatorie B7-1(CD80) e B7-2(CD86) espresse dalle APC attivate .

Il CD28 amplifica molte risposte dei linfociti T , come sopravvivenza , produzione di citochine come Il-2 e differenziazione in cellule effettrici e di memoria . B7-1 e B7-1 sono glicoproteine di membrana a singola catena , costituite da due domini extracellulari di tipo Ig , strutturalmente simili , ma B7-1 è espresso come dimero , mentre B7-2 come monomero ; queste due sono espresse soprattutto da APC professionali .

In vitro popolazioni di CD4+ rispondono all'antigene producendo citochine e proliferando solo quando l'antigene viene presentato da APC che esprimono B7 ; l'utilizzo di un anticorpo in grado di attivare CD28 ha evidenziato come CD28 attivato trasmette segnali costimolatori che permettono la risposta da parte dei Linfociti T anche *senza l'espressione delle molecole B7* ; il segnale costimolatorio fornito dagli anticorpi anti-CD28 in assenza del TCR non induce la risposta , quindi devono agire sempre in concomitanza ; topi knockout per B7 presentano un deficit della risposta T in seguito ad immunizzazione con antigeni proteici .

L'espressione delle molecole costimolatorie , data la loro importanza , è finemente regolata e garantisce che le risposte dei linfociti T siano attivate al momento e luogo opportuno . L'espressione di B7 viene aumentata da prodotti microbici che legano i Toll-like come le endotossine e poi anche da citochine come IFN-gamma prodotte durante la risposta immunitaria . Poi i linfociti T attivati esprimono CD40L ligando per il recettore CD40 sulle APC promuovendo l'espressione di B7 sulle APC (questa interazione aumenta anche l'attivazione dei linfociti T)

I Linfociti T effettori e quelli di memoria sono meno dipendenti dalla costimolazione fornita via B7:CD28 rispetto ai linfociti naive ; queste cellule possono infatti rispondere dolo la sola esposizione dell'antigene , infatti non necessitano della costimolazione , in quanto è già avvenuta prima della loro attivazione .

Un aspetto cruciale dell'interazione CD28:B7 è la generazione di Linfociti CD4+CD25+ , in grado di inibire le funzioni degli T effettori , perché il sistema immunitario adattativo è più aggressivo e quindi deve essere tenuto a freno ; questi si sviluppano nel timo e vengono definiti **linfociti T regolatori** naturali e la loro espressione richiede come detto l'interazione tra quel recettore e quella molecola costimolatoria .

I segnali inviati da CD28 incrementano la produzione di citochine come IL-2 fondamentale per la proliferazione autocrina , mediante l'aumento della trascrizione ; favorisce inoltre la sopravvivenza cellulare incrementando l'espressione di Bcl-x una proteina anti-apoptotica .

Una proteina chiamata ICOS (Inducible ICOSTimulator) , omologa a CD28 , è così chiamata perché viene indotta nei linfociti T in seguito all'attivazione e lega un ligando simile alle B7 ; questa proteina è importante per la produzione di citochine come IL-10 e per l'attivazione di linfociti T effettori .

Inoltre abbiamo CTLA-4(CD152) omologa di CD28 che è espressa dai linfociti T attivati ed avrà la funzione di inibire invece le risposte dei linfociti T e svolge un ruolo importante nella tolleranza verso antigeni autologhi .

Un'altra molecola costimolatoria è poi la CD2 .

- 1) Riconoscimento Ag
- 2) Attivazione linfociti (citochine)
- 3) Espansione clonale (proliferazione)
- 4) Differenziamento (Effettori e Memoria)
- 5) Funzioni:
 - Attivazione macrofagi e cellule B
 - Citotossicità

Trasduzione del segnale da parte del complesso recettoriale dei linfociti T

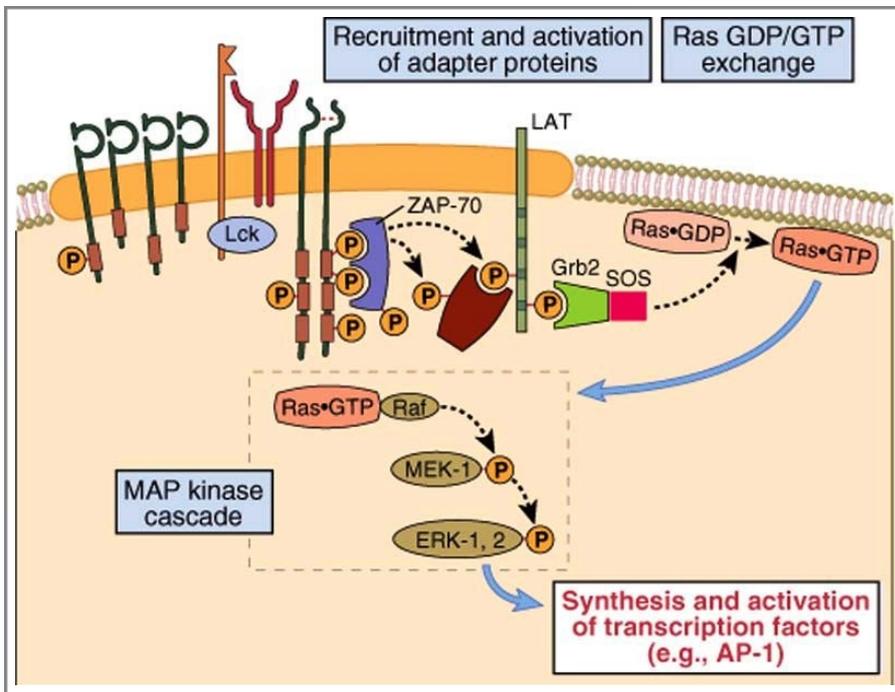
(queste sono le fasi della risposta T) . Le molecole costimolatorie come detto aiutavano la stimolazione vera e propria , che è quella del complesso TCR ; il

segnale inviato dal TCR andrà ad agire su dei fattori trascrizionali , che avranno come bersagli finale l'espressione di geni che naturalmente rimangono silenti , ma che devono essere attivati nel corso della risposta e quei geni sono i geni per le citochine e per il linfocita T la citochina più importante per la propria proliferazione è l'INTERLEUCHINA-2 ; come avevamo detto infatti , l'antigene era responsabile della specificità della risposta , mentre la costimolazione e le citochine sono fondamentali per l'espansione e la differenziazione .

Si svolge in tre tappe così riassumibili :

- 1) Attivazione delle TK tirosine chinasi , che si svolge nei pressi della membrana cellulare

- 2) Induzione della Cascata delle MAP chinasi e Calcineurina nel citoplasma
- 3) Attivazione dei fattori di trascrizione nel nucleo



Primo evento : Attivazione delle tirosine chinasi

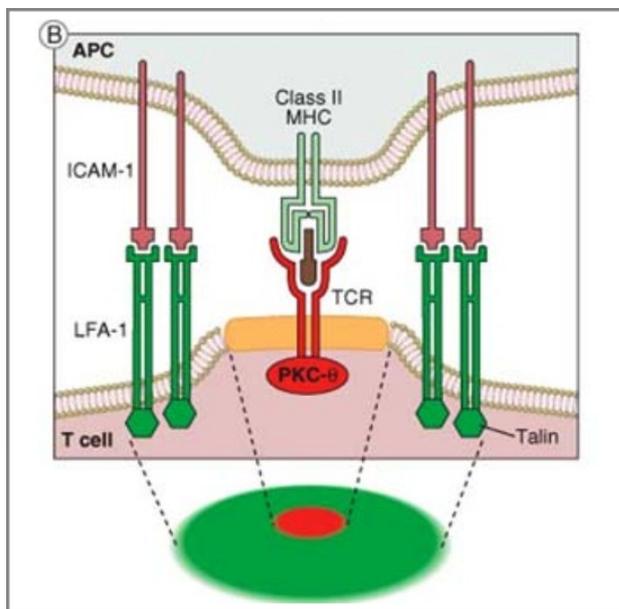
Le Tirosine Chinasi sono degli enzimi che catalizzano la fosforilazione di residui di tirosina ; come ben sappiamo le code citoplasmatiche dei CD3 e Zeta possiedono dei domini ITAM con delle tirosine ; Quando il TCR lega il complesso peptide-MHC , CD4 e CD8 legano contemporaneamente le regioni non polimorfe degli MHC ; questo avvicinamento dei CD4 porterà **Lck** (famiglia delle Src) , che è una tirosina chinasi associata alle code

citoplasmatiche CD4 CD8 , ad avvicinarsi alle sequenze ITAM di CD3 e Z ; Lck si attiva e va a fosforilare quelle tirosine e nell'arco di secondi , si vedono fosforilazioni multiple di residui di tirosina ; poi è presente anche Fyn , che si lega a CD3 e che svolge un ruolo analogo a Lck e fa parte peraltro della stessa famiglia Src . Queste sequenze ITAM fosforilate serviranno come "sito di ancoraggio" per **ZAP-70** (tirosina chinasi detta Zeta-Associated Protein di 70kD); questa fa parte di un'altra famiglia , quella Sky/Zap-70 , distinta da Src ; Zap-70 contiene due domini conservati importanti , chiamati SH2 (Src Homology) ognuno dei quali è in grado di legare una fosfotirosina ; come sappiamo ITAM ha due tirosine per ogni suo dominio e questi devono essere fosforilati (fosfotirosine) per essere legati da Zap-70 .Dopo che Zap-70 va a legarsi ad ITAM (nelle fosfotirosine) , diviene substrato per le molecole Lck ad essa adiacenti e viene fosforilata a sua volta ; questo comporta l'acquisizione della capacità fosforilativa , quindi acquisisce la capacità tirosina-chinasica . A questo punto , affinché la cascata della trasduzione possa continuare , è necessario raggiungere un valore soglia , quindi molteplici Zap-70 devono essere reclutate su più sequenze ITAM di CD3 e Z .

[Excursus sull'attività delle chinasi : L'attività delle tirosin-chinasi è regolata dalle tirosin-fosfatasi (vedi oltre) , che a differenza delle chinasi defosforilano . Le Tirosine chinasi (PTK) , mediano il trasferimento di gruppi fosfato dall'adenosina trifosfato , ATP , al gruppo idrossilico di un residuo di tirosina presente su di un substrato proteico ; le chinasi possono essere o dei recettori , o componenti intrinseci di recettori di membrana oppure legate a proteine adattatrici , o ancora citoplasmatiche ,

come nel caso dei linfociti T e B ; esistono tirosine chinasi di membrana , dove sono porzioni della catena del recettore e quindi hanno attività chinasi intrinseca ,poi chinasi citoplasmatiche , di cui vediamo tre famiglie , che partecipano dell'attivazione dei linfociti T e sono la famiglia Src , la famiglia Sky/Zap-70 e Tec , ma le prime due sono le più importanti senza dubbio . Le proteine della famiglia **Src** chinasi mostrano delle omologie di sequenza con il gene trasformante del virus sarcoma di Rous , da cui prendono il nome , il primo virus oncogeno animale identificato ; questa famiglia comprende Src , Fyn e Lck (i più rilevanti) ; le PTK della famiglia Src presentano due domini interni chiamati domini di omologia Src di tipo 2 (**SH2**) e di tipo 3 (**SH3**) , ciascuno dei quali è responsabile di interazioni specifiche . I domini SH2 hanno una lunghezza di 100 aa e si legano alle fosfotirosine presenti nella struttura di altre proteine ; i domini SH3 hanno una lunghezza di 60 aa e sono anch'essi coinvolti nelle interazioni tra proteine , ma questi si legano a residui di prolina e si pensa possano agire cooperando con SH2 (per le mutazioni del dominio SH3 della tirosina chinasi di Bruton , troviamo difetti di trasduzione che sfociano nell'agammaglobulinemia) . La famiglia di **SkyZap-70** , sono due membri , Sky e Zap-70 ; Sky è preferenzialmente espresso in linfociti B , mentre Zap-70 solamente in T e NK ; in questa famiglia di PTK sono presenti due domini SH2 e come detto queste PTK si attivano col legame a fosfotirosine]

Parallelamente (subito dopo l'ingaggio del TLR) Sinapsi Immunologica :



La regione di contatto tra Linfocito T ed APC è identificata come **Sinapsi Immunologica SMAC** . Complesso TCR , CD4 e CD8 , CD3 e Zeta , CD28 , chinasi e quant'altro , vengono reclutate e concentrate in questa regione , in questa zona molto importante , chiamata c-SMAC (centrale) , dove la distanza tra le membrane affrontate è di circa 15 nm ; per quanto riguarda le regioni periferiche di questa , vediamo che è leggermente più ampia , perché il distacco è lievemente maggiore , infatti è di 40 nm e viene definita p-SMAC (periferica) dove osserviamo delle Integrine che hanno il compito di stabilizzare il legame tra i due tipi cellulari . Le sinapsi immunologiche hanno diverse funzioni , infatti

questa (1) è una regione preferenziale per l'attivazione del TCR , perché concentra quelle poche molecole MHC caricate col peptide specifico in zone ben precise e promuove così più ingaggi del TCR ; (2) permette il rilascio di granuli secretori o di segnali all'APC o alla cellula bersaglio specifica , infatti il rilascio delle vescicole del CD8+ contenenti perforina e granzima , avviene a livello delle sinapsi e anche il rilascio di alcune citochina ; (3) è anche il sito preferenziale per la degradazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale e quindi contribuisca a porre fine al processo di attivazione dei linfociti T .

Secondo Evento : Reclutamento e Attivazione di proteine adattatrici

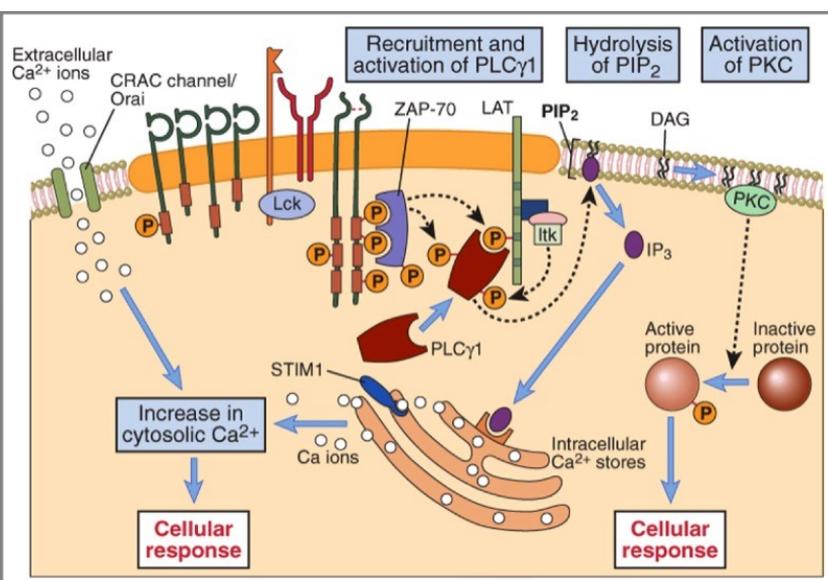
In questa fase vediamo l'attivazione della cascata enzimatica delle MAP , quali ERK e JNK , da parte di Ras e Rac dopo che sono attivate .

Dopo l'attivazione , Zap-70 andrà a fosforilare substrati che fungono da proteine adattatrici , quindi recluta delle proteine adattatrici , le quali servono a localizzare determinate proteine in punti specifici , promuovendo la segnalazione intercellulare . Zap-70 andrà a fosforilare la proteina adattatrice LAT (Linker of Activation of T cells) , la quale coordinerà il movimento di altre proteine come Grb2 , quindi serve a raggruppare componenti della trasduzione del segnale .

LAT fosforilato (da Zap-70) diventa un sito di ancoraggio per il dominio SH2 di Grb2 che una volta associata a LAT , recluta **Sos** uno scambiatore GTP/GDP di **Ras** ; Ras è una proteina dotata di attività fosfatase per i nucleotidi guaninici trifosfato (GTP) ed è debolmente associata alla membrana cellulare e nella sua forma inattiva il sito di legame del nucleotide guaninico è occupato da una molecola di guanosina difosfato (GDP) e quando questa viene sostituita con GTP , Ras cambia conformazione e può reclutare numerosi enzimi cellulari ; la forma attiva è nota come **Ras*GTP** e agisce come attivatore allosterico di una famiglia di enzimi chiamati MAP chinasi . Questa famiglia possiede due tipi principali di MAP chinasi , **ERK** (Extracellular Receptor-activated Kinase) e **JNK** (c-Jun N-terminal Kinase) . ERK viene fosforilato da Ras*GTP , trasloca nel nucleo e va a fosforilare una proteina chiamata Elk , che a sua volta stimola la trascrizione di Fos , un componente di un fattore di trascrizione noto come **AP-1** (Activating Protein-1) ; contemporaneamente le stesse molecole adattatrici , quindi Grb2 e LAT reclutano un altro scambiatore GTP/GDP chiamato **Vav** , che agisce su un'altra proteina G a basso molecolare (come Ras) chiamata Rac ; come prima , il complesso **Rac*GTP** innesca una cascata enzimatica parallela a Ras e porta all'attivazione di JNK , la quale una volta attivata , fosforila Jun , il secondo

componente del fattore di trascrizione AP-1 . Quindi porteranno tutte e due le vie all'attivazione di questo fattore di trascrizione AP-1 molto importante . LAT però non recluta solamente Grb2 , ma va a legare anche l'isoforma gamma-1 dell'enzima **fosfolipasi C** o **PLC-gamma-1** . Questo enzima viene fosforilato (dopo essere stato legato da LAT) da Zap-70 e da un'altra chinasi , appartenente alla famiglia Tec , **Itk** .

Nella sua forma fosforilata , la fosfolipasi C ,



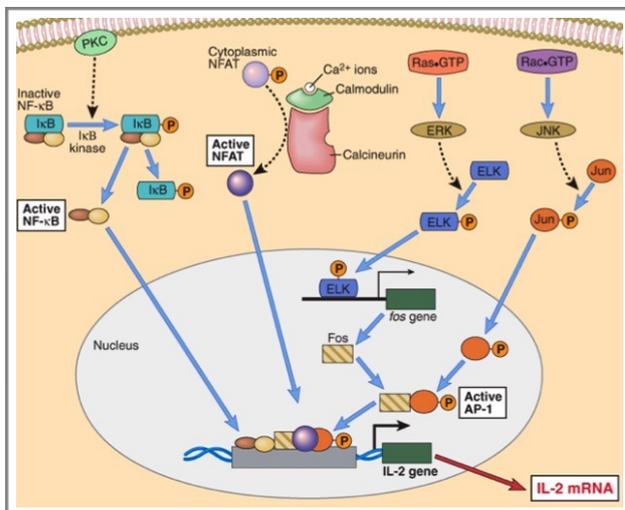
catalizza l'idrolisi di un fosfolipide di membrana o **PIP2** (fosfatidilinositolo bifosfato) , con la formazione di due prodotti : **IP3** (inositolo trifosfato) e **DAG** (diacilglicerolo) . Questi due attiveranno due differenti vie .

- 1) **IP3** generato a livello della membrana plasmatica , diffonde nel citosol e giunge nel RE dove si lega ad un recettore specifico e stimola il rilascio di calcio immagazzinato contenuto in vescicole ; questo rilascio determina un aumento immediato del calcio , passando da una concentrazione di 100 nM ad una di 600-1000 nM ; questo attiva dei canali di membrana chiamati CRAC (Calcium Release Activated Calcium) che promuovono un nuovo ingresso di calcio nella cellula permettendo di mantenere ad alti livelli la concentrazione di questi ione per oltre un'ora ; il calcio citoplasmatico interagisce con la calmodulina , ed il complesso calcio-calmodulina attiva una fosfatasi serina/treonina chiamata **calcineurina** (che attiva NFAT) .
- 2) Il DAG , secondo prodotto dell'idrolisi del fosfatidilinositolo bifosfato , in associazione con la concentrazione di calcio molto alta , attiva la **proteina chinasi C (PKC)** , coinvolta nella traslocazione del fattore di trascrizione NF- κ B (fattore nucleare κ B) . Infatti promuove la formazione di un complesso trimerico formato da CARMA-1 , MALT-1 e Bcl-10 che ha funzione di ubiquitina ligasi (vedi oltre) e che promuove l'ubiquitinazione di inibitori di NF κ B .

Tutte queste vie , quindi l'attivazione di AP-1 , l'attivazione della calcineurina (che attiva NFAT) e l'attivazione della PKC , avranno come scopo univoco quello di legarsi ai promotori dell'Interleuchina-2 .

Il promotore dell'IL-2 si trova all'estremità 5' , contiene circa 300 paia di basi che hanno siti di legame per diversi fattori di trascrizione e per una trascrizione massimale del gene c'è bisogno che siano tutti occupati di rispettivi fattori di trascrizione . Esistono tre fattori di trascrizione che sembrano svolgere la maggior parte delle risposte T e sono :

NFAT , AP-1 e NF- κ B



NFAT , o Nuclear Factor of Activated T cells , è un fattore di trascrizione necessario per l'espressione dei geni di IL-2 , IL-4 e TNF . NFAT è presente nel citoplasma nella sua forma inattiva fosforilata in serina e viene attivato dalla calcineurina ; la calcineurina defosforilando NFAT rende disponibile quel segnale che è necessario per la propria localizzazione all'interno del nucleo , giungendo così alla regione promotore 5' dei geni per

IL-2 e -4 ; questo fattore di trascrizione unisce assieme ad AP-1 .

AP-1 è un fattore di trascrizione che si trova in molti tipi cellulari , ma viene attivato specificamente dai linfociti T ; è composto da un dimero legato da una regione cerniera di leucina , il dimero formato da Fos e Jun (per i quali hanno agito Ras e Rac) ; come per NFAT questo attivato raggiunge il nucleo e può legarsi al promotore agendo assieme a NFAT .

NF- κ B invece è un fattore di trascrizione essenziale per la sintesi di citochina ed è presente nei linfociti T quiescenti associato alle proteine inibitori di κ b (**I κ b**) , che ne bloccano l'ingresso al nucleo ; i segnali dal TCR inducono la fosforilazione di I κ b da parte delle I κ b chinasi e successivamente la sua ubiquitinazione con degradazione nel proteasoma associata .

Come già detto , tutti e tre questi fattori (come si vede nell'immagine) andranno a legare le regioni promotore dell'IL-2 per massimizzare la trascrizione di questi geni che naturalmente sono silenti , ma che durante l'attivazione del TCR devono essere attivati per promuovere la diffusione di IL-2 con conseguente proliferazione dei linfociti T .

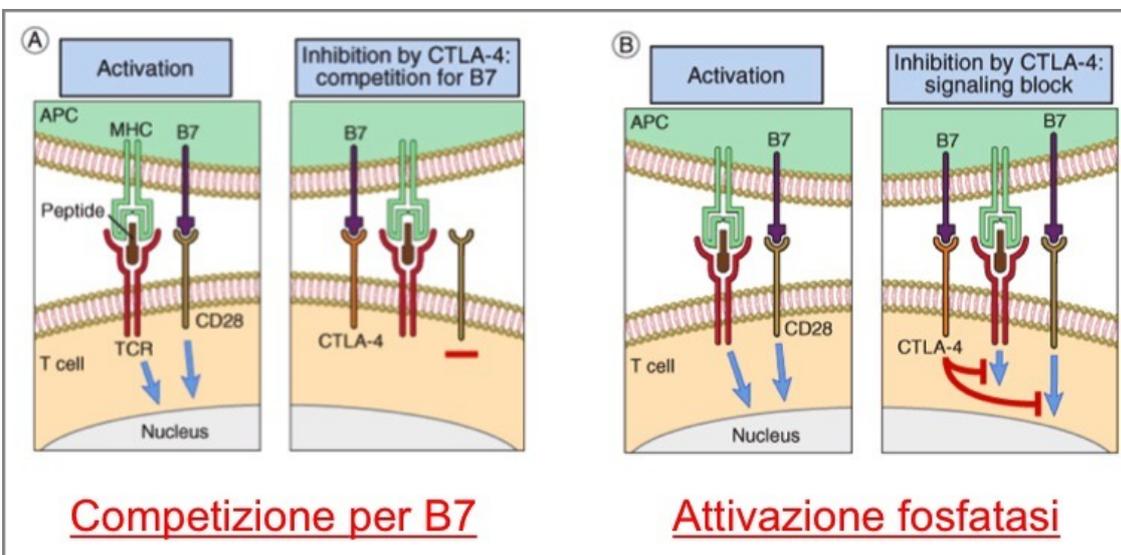
Le molecole costimolatorie , avranno più o meno gli stessi effetti di queste trasduzioni , in quanto la coda del CD28 contiene residui di tirosina che in seguito a fosforilazione reclutano la subunità regolatoria dell' IP3 chinasi ; inoltre promuove sia la via Ras/ERK MAP chinasi che la via Rac/JNK , ecco come danno la costimolazione , che come detto è fondamentale per il secondo segnale .

Attenuazioni della risposta T : ruolo dei recettori inibitori e dell'ubiquitina ligasi

Come detto precedentemente le vie di attivazione dei linfociti T devono essere regolate e tenute a freno e questi meccanismi di controllo coinvolgono il reclutamento di Tirosine Fosfatasi come

SHP-1 , l'attivazione di recettori inibitori come CTLA-4 e il reclutamento di ubiquitina ligasi E3 , oltre a meccanismi di defosforilazione .

CTLA-4 lo avevamo già incontrato (capitolo7) fa parte della famiglia di

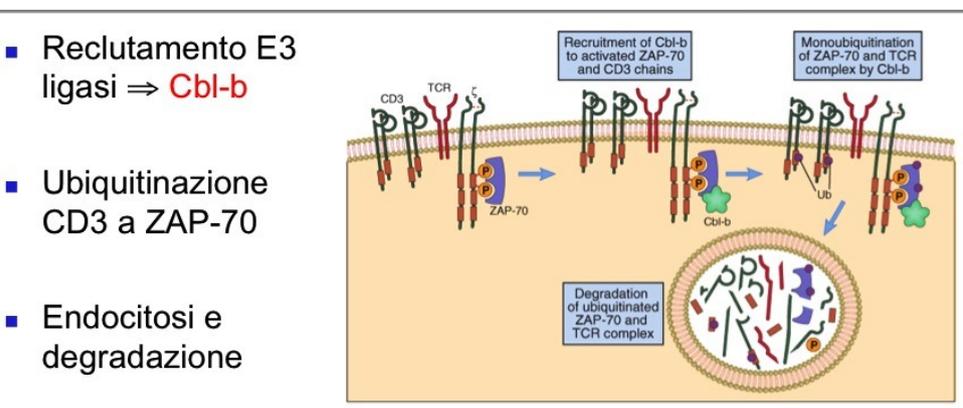
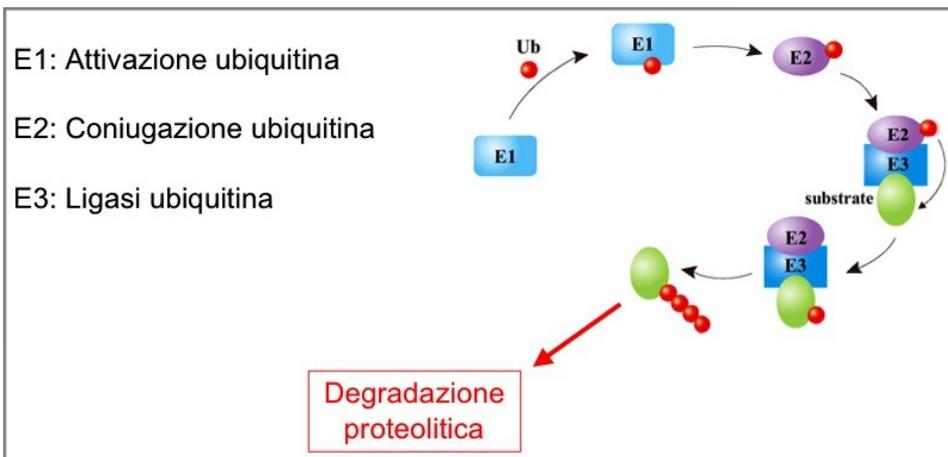


CD28 ed è un recettore inibitore ; topi che mancano di CTLA-4 avranno severe reazioni infiammatorie sistemiche contro molti tessuti , infatti CTLA-4 ha un ruolo nel controllo della tolleranza agli antigeni self ; anticorpi che bloccano CTLA-4 sono in grado di aumentare la risposta T nel confronto dei tumori , infatti è stato generato un anticorpo anti CTLA-4 in combinazione con vaccini tumorali ; comunque ancora oggi non è chiaro come questo recettore inibisca la risposta T ; tuttavia la maggior parte di questi recettori è racchiusa in vescicole intracellulari e da qui è rapidamente mobilizzata alle sinapsi immunologica durante l'attivazione , dove può inibire il CD28 in due modi , o "rubando" al CD28 il legame con molecola costimolatoria B7 , oppure può bloccare la fosforilazione della catena Zeta associata al TCR mediante il reclutamento di una fosfatasi SHP-2 nella sinapsi ; CTLA-4 possiede un'affinità per B7 50 volte superiore rispetto a CD28 , è possibile quindi che le APC che esprimono un numero ridotto di molecole B7 in membrana possano legare preferenzialmente CTLA-4 e ciò permetterebbe alle APC non attivate che presentano autoantigeni in assenza di molecole costimolatorie di essere tolleranti , mentre durante un processo infettivo , in cui l'espressione di B7 viene aumentata , sarebbe preferito il legame col CD28 e la conseguente attivazione della risposta T . I linfociti T naive esprimono CD28 , mentre non esprimono CTLA-4 quindi questa avviene solamente dopo l'attivazione cellulare e quindi vuol dire che i naive utilizzano i CD28 per iniziare le risposte cellulari mentre l'attivazione tardiva di CTLA-4 sarebbe coinvolta

nell'attenuazione di tali risposte .

Infine **l'ubiquitina ligasi E3** è un enzima che attacca i residui di ubiquitina a specifiche proteine bersaglio . L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi attivati da un enzima E1 per essere poi trasportata da un enzima E2 su uno specifico substrato che viene riconosciuto dall'ubiquitina ligasi E3 . Le ligasi E3 sono enzimi che riconoscono simultaneamente un enzima E2 pronto a ubiquitinare e anche un substrato che ora viene posto in prossimità dell'enzima E2 . Vengono legate così catene di poli-ubiquitina che porteranno alla degradazione proteolitica .

Queste molecole sono importanti nei processi di attenuazione delle



risposte T . Il prototipo di queste ligasi è la **Cbl-b** . Questa facilita la monoubiquitinazione di Zap-70 e dei domini citosolici di CD3 e indirizzano quindi il complesso TCR-CD3 e Zap-70 alla degradazione lisosomiale , disattivando di fatto la trasduzione del segnale ; topi privi di questa ligasi sviluppano patologie autoimmuni come risultato dell'eccessiva attivazione dei linfociti T , perché vengono prodotti senza controllo quantità abnormi di IL-2 .

P.S. se qualche meccanismo non dovesse essere chiaro questi siti potrebbero essere utili , sono video

<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Bio307.html#anchor24514174>

<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Flash/Bcellmat.html>

<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Flash/Bselect.html>

Capitolo 10

Attivazione dei Linfociti B e Produzione di Anticorpi

Caratteristiche Generali delle Risposte Immunitarie Umorali

La funzione degli anticorpi è quella di legarsi ai determinanti antigenici di microrganismi extracellulari causandone la neutralizzazione e/o l'eliminazione .

I Linfociti B si sviluppano nel midollo osseo e poi migrano negli organi linfoidi secondari dove avviene l'interazione con l'antigene ; quando avviene il riconoscimento tramite il BCR , si attiva il linfocito B e questa può avvenire in due modi principali , un modo che dipende dai Linfociti T e uno che non dipende dai linfociti T ; tuttavia che dipenda o non dipenda , la fase effettrice sarà quella della generazione di plasmacellule in grado di produrre anticorpi e di cellule memoria ; in una settimana un linfocito B può generare una progenie di circa 4000 plasmacellule che producono 10^{12} anticorpi

La via dipendente dai linfociti coinvolge i CD4+ Helper che andranno ad interagire con le cellule B nel caso in cui si parla di antigeni proteici ; La via indipendente dai linfociti T riguarda quella classe di antigeni multivalenti , che hanno quindi più determinanti dello stesso tipo all'interno della loro configurazione e che quindi non richiedono dell'intervento dei CD4 per la loro attivazione , come polisaccaridi e lipidi .

Le risposte umorali hanno inizio negli organi secondari come la milza (nel circolo ematico) , i linfonodi drenanti(antigeni penetrati dalla cute o epiteli) e il MALT(antigeni ingeriti o inalati) .

Una parte dei B differenzia diventando cellule memoria che saranno fondamentali nel caso di un rinnovato contatto con lo stesso antigene in quella che è definita risposta secondaria ; infatti viene detta risposta primaria , la risposta che viene data ad un antigene mai incontrato prima e quindi da un naive ; la risposta secondaria invece non sarà data da un naive , ma da cellule di memoria che quindi già erano attivate e non hanno bisogno di ulteriori attivazioni per poter originare la risposta immunitaria , in quanto quell'antigene lo conoscono già . La risposta secondaria sarà più efficiente non solo a livello quantitativo , ma anche a livello qualitativo .

I processi di scambio isotipico e di maturazione dell'affinità avvengono tipicamente nelle risposte T-dipendenti . Lo scambio isotipico permette ad un linfocita B che riconosce l'antigene proteico attraverso il BCR (formato da IgM e IgD) di cambiare la catena pesante per dare una risposta a quegli anticorpi del recettore e quindi generare diversi isotipi con la stessa specificità per quell'antigene . La maturazione dell'affinità invece riguarda solo la specificità , in quanto viene fatto proliferare solo quel clone che ha riconosciuto l'antigene .

Le risposte immunitarie possono distinguersi sulla base dei diversi siti anatomici ove avvengono , ad esempio nelle mucose vengono maggiormente prodotte IgA .

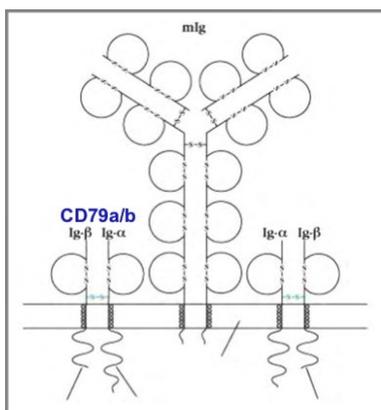
Riconoscimento dell'antigene e attivazione dei linfociti B

L'attivazione richiede il riconoscimento dell'antigene a livello dei tessuti linfoidi secondari , dove i linfociti B ricircolano ininterrottamente fino alla ricerca dell'antigene ; questo ricircolo è permesso dalla chemochina CCL13 per il quale hanno il recettore CCR5 ; queste chemochine vengono

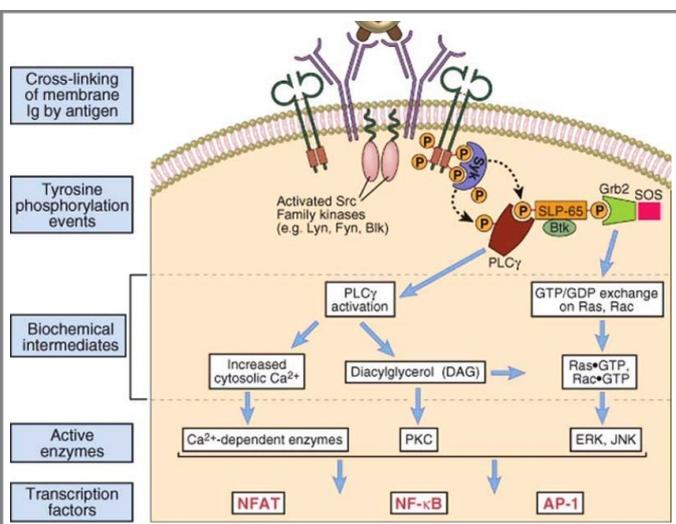
prodotte sia dalle cellule stromali degli organi linfoidi secondari , esclusivamente nelle aree dove si concentrano i Linfociti B e vengono prodotte anche dalle cellule dendritiche follicolari (FDC) , con le quali i linfociti andranno ad interagire . Il linfocito naive sopravvive per periodi limitati nel follicolo , tutto comunque come sempre dipende dai segnali che il BCR invia , se siano segnali di sopravvivenza o di morte , questo dipende dal contatto col ligando ; esiste inoltre una citochina chiamata **BAFF** (B-cell Activating factor of the TNF Family) che fornisce segnali per la maturazione e la sopravvivenza e viene prodotto dalle cellule mieloidi del follicolo e dal midollo osseo .

Le cellule dendritiche che riconoscono l'antigene giungono negli organi linfoidi periferici dove avranno contatti coi linfociti ; possono processarlo ed esporlo sulla superficie per presentarlo ai Linfociti T , oppure possono mantenerlo nella forma nativa ed esporlo ai linfociti B . Antigeni solubili inoltre possono penetrare nel follicolo ed essere riconosciuti dai B .

Il BCR si attiva solamente quando subisce un'aggregazione , quindi quando due o più BCR si aggregano e interagiscono tra di loro dopo aver legato lo stesso antigene multivalente , che avrà quindi più siti di legame per i recettori e sarà quindi riconoscibile da più recettori contemporaneamente .



Il BCR è formato da Ig di membrana più CD79-a/b . E' formato da una immunoglobulina , IgM e IgD , caratterizzata da due brevi code citoplasmatiche che quindi non potranno trasdurre il segnale generato dal riconoscimento dell'antigene ; questi segnali infatti sono trasdotti da CD79 o Ig-alfa e Ig-beta legate insieme da ponti disolfuro (che hanno le funzioni di CD3 e Zeta nei linfociti T) ; queste sono necessarie per l'esposizione delle Ig di membrana e contengono le sequenze ITAM responsabili della trasduzione ; Ig-alfa e Ig-beta sono inoltre associate in modo labile a tirosina-chinasi della famiglia Src .



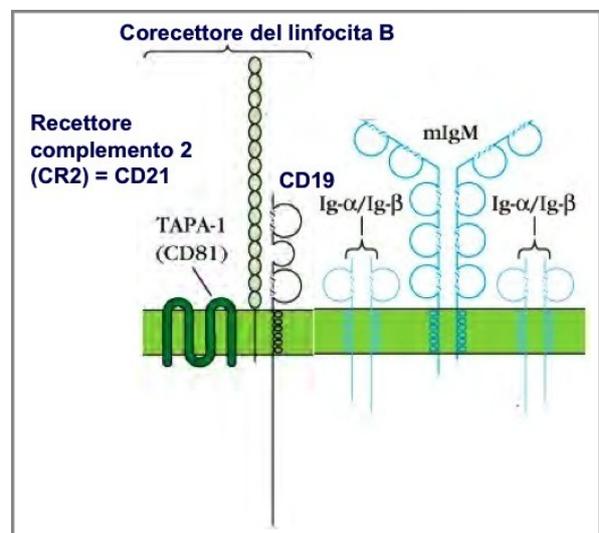
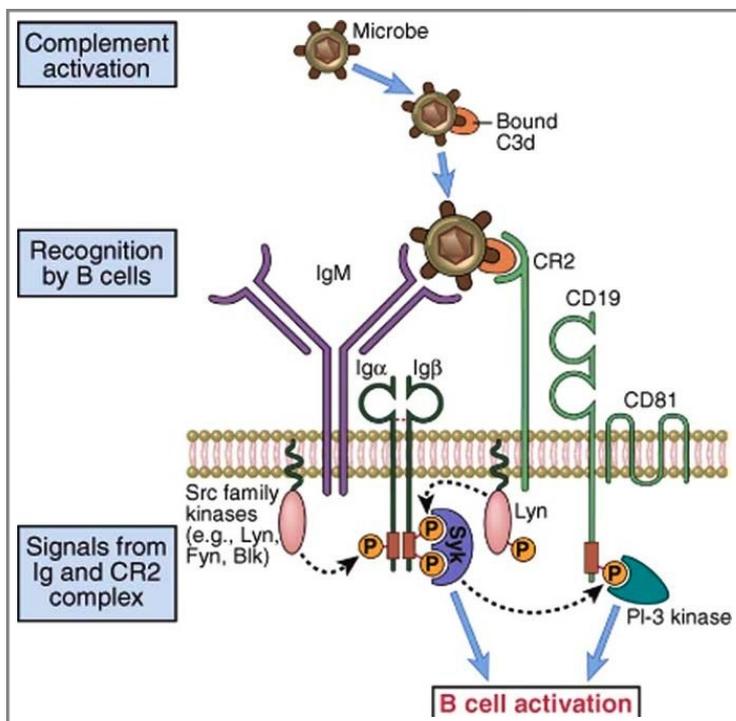
L'aggregazione dei BCR attiva le chinasi Src che fosforilano ITAM e poi prendono via i passaggi successivi ; le sequenze ITAM interagiscono con i domini SH2 della TK Sky (come Zap-70) ; Sky viene a sua volta fosforilata e causa la fosforilazione di specifici residui di tirosina della proteina adattatrice SLP-65 (SH2 binding leukocyte phosphoprotein of 65 kD) chiamata anche BLNK che recluta altri enzimi con domini SH2 e domini PTB(Phospho-Tyrosine-Binding) . Questi ultimi includono proteine scambiatrici di GTP/GDP che attivano Ras e Rac e la Fosfolipasi C , nonché Btk

Sos viene reclutato da SLP-65 legando Grb-2 e attiva Ras e parallelamente viene attivato Rac .

In risposta al segnale trasdotto dal complesso del BCR , viene attivata la fosfolipasi C nella sua isoforma gamma2 PLC-gamma2 quando viene a legarsi con SLP-65 venendo fosforilata da Syk e Btk ; la fosfolipasi libera dal PIP2 sempre IP3 e DAG come nei linfociti T ; DAG attiva proteine chinasi C (beta) ; questa chinasi PKC-beta che fosforila la proteina CARMA1 . Assieme al reclutamento di Bcl10 e MALT1 con cui forma un complesso , induce l'attivazione di IKK(IkB Kinase) fondamentale per attivare NFkB , perché IkB è un inibitore , come nei T .

Sostanzialmente le sequenze sono simili ai linfociti T e riassumendo vediamo come Sky fosforila prima i domini ITAM delle Ig-alfa e -beta per poi essere fosforilato a sua volta (da chinasi della Src associate al BCR di cui non si fa nome) per poter fosforilare ancora la SLP-65 , la proteina adattatrice responsabile dell'attivazione di tutte le vie ; questa infatti lega il Grb-2 e di conseguenza Sos andando ad attivare Ras e Rac per attivare AP-1 ; SLP-65 lega però anche la fosfolipasi C che a questo punto viene fosforilata da Syk e Btk e produce l'aumento di calcio intracellulare e di DAG (dall'IP2) , necessari per attivare enzimi calcio dipendenti e proteine chinasi C responsabili rispettivamente di attivare NFAT e NFkB ; quindi il risultato è sempre quello di attivare i tre fattori trascrizionali che andranno a legare la regione promotore delle citochine .

Vediamo che oltre alla stimolazione dal BCR esistono le proteine del complemento e il recettore CD21 che danno stimoli ulteriori , accessori , di amplificazione della risposta B .



Il sistema del complemento è un gruppo di proteine plasmatiche che si attivano legandosi agli immunocomplessi (via classica) o che reagiscono in assenza di anticorpi (nella via alternativa) o

ancora una via lectinica ; ora ci interessa la prima via ; gli antigeni possono legarsi agli anticorpi e attivano così il complemento , dove viene provocata la scissione della sua componente C3 in C3b che

si lega all'immunocomplesso , poi b viene degradato ulteriormente a d e resta legato alla superficie microbica ; i Linfociti B possiedono un recettore per C3d o recettore per il complemento di tipo 2 (**CR2** o **CD21**) .

Il complesso formato da C3d con l'antigene o con l'immunocomplesso , si lega ai B e col BCR prende contatto diretto con l'antigene , mentre con CR2 prende contatto con C3d ; CR2 è espresso sulla membrana come **complesso trimolecolare** associato a CD19 e CD81 (chiamato anche TAPA-1) ; il legame di CR2 a C3d porta CD19 in prossimità delle chinasi associate a BCR , quindi CD19 viene fosforilato e causa il reclutamento di Lyn che va a fosforilare le sequenze ITAM di Ig-alfa e Ig-beta , le quali saranno riconosciute da Syk per i domini SH2 Lyn quindi **amplifica** il segnale ; CD19 fosforilato inoltre è in grado di attivare una via del segnale dipendente da PI-3K una chinasi del fosfatidilinositolo-3 , la quale potenzia l'attivazione di Btk e PLC-gamma-2 .

C3d legandosi a CD21 potenzia quindi la trasduzione del segnale di BCR in modo simile a CD4 e CD8 per il TCR , quindi CD21 contribuisce all'efficienza del segnale generato dal BCR ; i veri segnali di costimolazione sono quelli generati da CD40 e dai TLR .

Il riconoscimento dell'antigene determina l'entrata nella fase G1 , quindi aumentano le dimensioni cellulari , c'è più RNA e ci sono più ribosomi , quindi viene incrementata la sopravvivenza dal riconoscimento .

Inoltre i linfociti B aumentano l'espressione delle molecole MHCII e di vari costimolatori , prima B7-2 e poi B7-1 , motivo per cui i linfociti B attivati attivano i linfociti T helper più efficacemente rispetto ai naive ; viene aumentata l'espressione dei recettori per le citochine come BAFFA e IL-2 , IL-4, viene profondamente modificato il profilo d'espressione dei recettori per le chemochine passando da CXCL5 a CCR7 , infatti vedremo che le B per interagire con i T migrano verso questi , portandosi nelle giunzioni tra area B e area T .

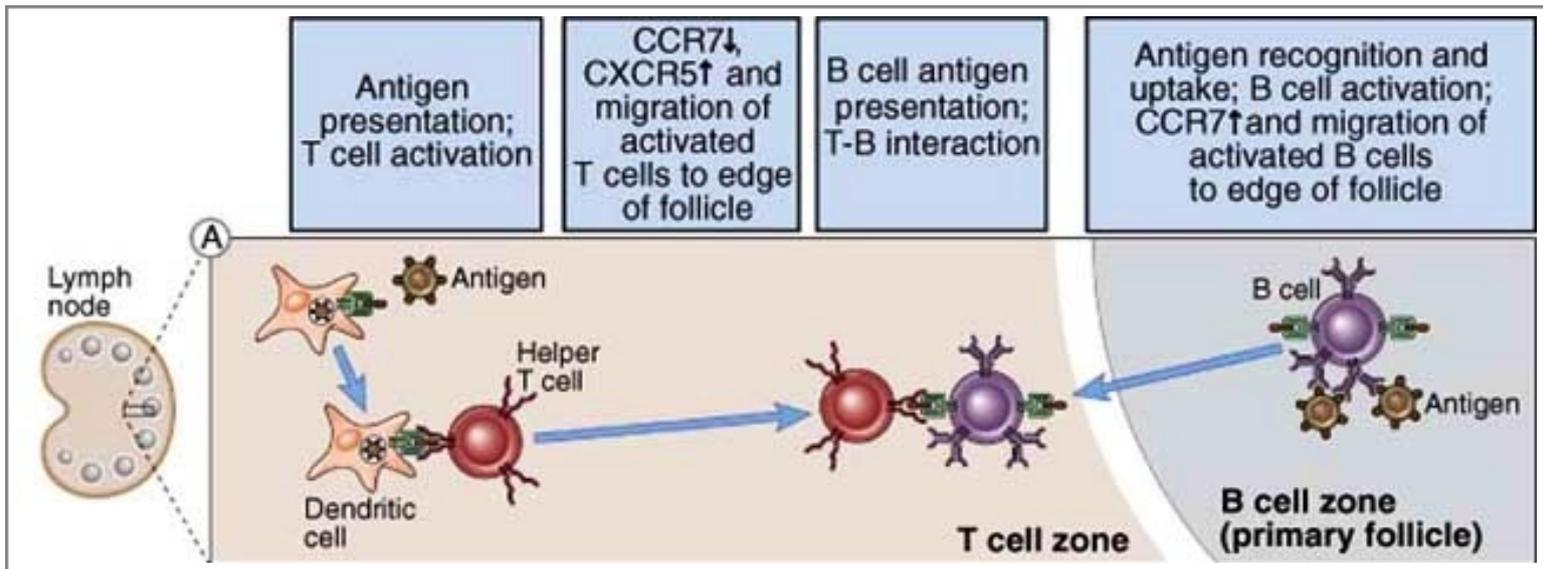
- Le risposte dei linfociti B sono di due tipi principali : T-Dipendenti quando si tratta di antigeni proteici e poi T-Indipendenti .

Risposte anticorpali agli antigeni proteici dipendenti dai linfociti T helper

Gli antigeni proteici dipendono dal riconoscimento da parte dei linfociti T Helper e quindi richiedono la cooperazione di B e T specifici per lo stesso antigene .

I Linfociti T helper stimolano l'espansione clonale , scambio isotipico , maturazione dell'affinità e differenziazione dei linfociti B in cellule di memoria .

L'attivazione T-dipendente si verifica con fasi successive in zone distinte ; le prime fasi si svolgono



all'interfaccia tra aree T e follicoli (ricche di B) e viene indotta la proliferazione di B , secrezione di anticorpi e switch isotipico ; poi le fasi successive in un microambiente specializzato nei centri germinativi dei follicoli linfoidi , per la maturazione dell'affinità , della generazione di B memoria e della continuazione dello switch .

- Fasi della risposta T-dipendente

1) Attivazione dei linfociti T helper

L'antigene viene catturato dalla cellula dendritica che ha il compito di presentarla al CD4+ naive come peptidi su MHC II ; contemporaneamente i ligandi DC esprimono B7-1 e B7-2 le molecole costimolatorie che andranno ad interagire con CD28 ; questi T helper si attivano e proliferando producono CD40L e producono citochine ; ancora però modificano radicalmente il loro profilo di espressione delle chemochine che finora li ha fatti rimanere nelle aree T , infatti esprimevano CCR7 , invece ora esprimono CXCR5 che li porterà nelle zone dove viene prodotta la chemochina CXCL13 , nel follicolo dove ci sono i linfociti B .

2) Presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B e loro migrazione

Il Linfocito B specifico per lo stesso antigene l'avrà riconosciuto , avrà processato l'antigene e lo avrà esposto assieme ai recettori per le molecole costimolatorie del linfocito T (CD40-->CD40L) Sia i Linfociti B che i Linfociti T sono attivati dallo stesso antigene specificamente e cambiano il loro profilo di espressione dei recettori per le chemochine contemporaneamente , perché si dirigono l'uno verso l'altro . I linfociti B quindi cambiano il profilo cominciano ad esprimere il CCR7 per le CCL19

e CCL21 e i linfociti T esprimono CXCR5 per CXCL13 ; questa combinazione porterà all'incontro delle due specie in contatto al margine del follicolo .

3) Attivazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper

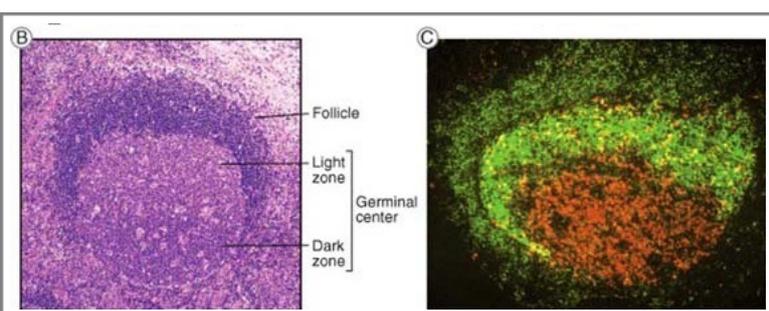
I Linfociti T helper attivati esprimono CD40L , il ligando per il recettore dei linfociti B CD40 ;

CD40 appartiene alla famiglia dei recettori per TNF , espresso costitutivamente sui B , mentre CD40L è una proteina omologa a TNF e al ligando di Fas e viene espressa sui linfociti T helper attivati ; CD40 interagisce con CD40L e ciò porta un'alterazione della struttura di CD40 che induce un reclutamento , in corrispondenza dei suoi domini citoplasmatici , delle proteine citosoliche dette TRAF (TNF Receptor-Associated Factors) le quali innescano una cascata enzimatica che porta all'attivazione e alla traslocazione nucleare di NFκB e AP-1 ; l'attivazione di questi fattori è fondamentale per la generazione dei centri germinativi e per l'induzione dello switch isotipico e lo scambio di Ig , infatti topi knockout per i geni che codificano per tali proteine mostrano gravi deficit nella produzione di anticorpi , nello scambio isotipico , nella maturazione dell'affinità e nello sviluppo . I linfociti T helper attivati secernono citochine che agiscono coordinatamente con CD40L per stimolare la proliferazione e la produzione di anticorpi di diversi isotipi , quindi le citochine inducono proliferazione e differenziamento B e lo scambio isotipico . Le citochine prodotte dagli T helper sono IL-2 , IL-4 , IL-6 e IL-21 che sono importanti per i linfociti B .

L'attivazione dei B contribuisce alla formazione di foci extrafollicolari di linfociti B attivati che possono andare incontro a un certo grado di differenziamento e scambio isotipico ; queste foci contengono fino a 200 plasmacellule secernenti anticorpi (nella milza PALS) e qui possono avvenire scambi isotipici .

Riassumendo , i linfociti B che hanno incontrato i linfociti T helper nella zona di margine del follicolo vengono quindi attivati da CD40L e dalle citochine prodotte da questi e poi ritornano all'interno del follicolo , dove avviene la parte più rilevante dei processi di scambio di classe , mutazioni somatiche e selezione che portano alla maturazione dell'affinità delle Ig e alla generazione dei linfociti B di memoria .

4) La reazione del centro germinativo



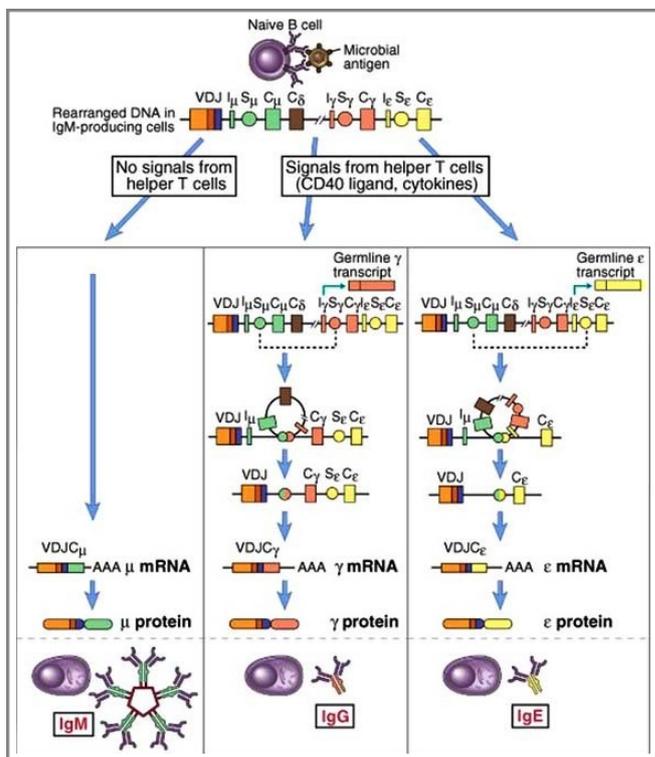
La sequenza di eventi caratteristica avviene nei centri germinativi dei follicoli linfoidi . Dopo essere ritornati nel follicolo (dopo 4-7 giorni dall'attivazione) da linfociti attivati , questi cominciano a proliferare attivamente formando una regione centrale di colore più chiaro

chiamata centro germinativo . Il **centro germinativo** avrà una struttura caratteristica , formata da una zona centrale più scura , una zona intermedia chiamata zona chiara (ed una zona più esterna chiamata zona mantello)

Nella Zona Scura , vediamo i linfociti B in attiva proliferazione , chiamati anche centroblasti ; il loro tempo di proliferazione è stimato a 6-12h quindi un singolo linfocita può dare origine a un clone di 5000 cellule in meno di 5 giorni, quindi alla fine di questo processo , ogni centro germinativo conterrà cellule derivate da un singolo o pochi linfociti con quella specificità ; questi avranno altri processi di differenziamento nella zona chiara . La zona Scura contiene maggiormente linfociti B quindi e una minor quantità di FDC ;

Questa architettura dipende fortemente dalle cellule follicolari dendritiche (FDC) , che si ritrovano solo nei follicoli linfoidi , non esprimono molecole MHC II , ma esprimono recettori per complemento (CR1-2-3) e recettori per Fc , tutti quanti coinvolti nella stimolazione dei linfociti B ; non è chiaro come abbiano origine , ma derivano dal midollo osseo e sono nettamente differenti rispetto alle DC che invece hanno MHC II ; morfologicamente , le FDC presentano lunghi prolungamenti citoplasmatici che vanno a costituire un'intelaiatura intorno alla quale si forma il centro germinativo ;

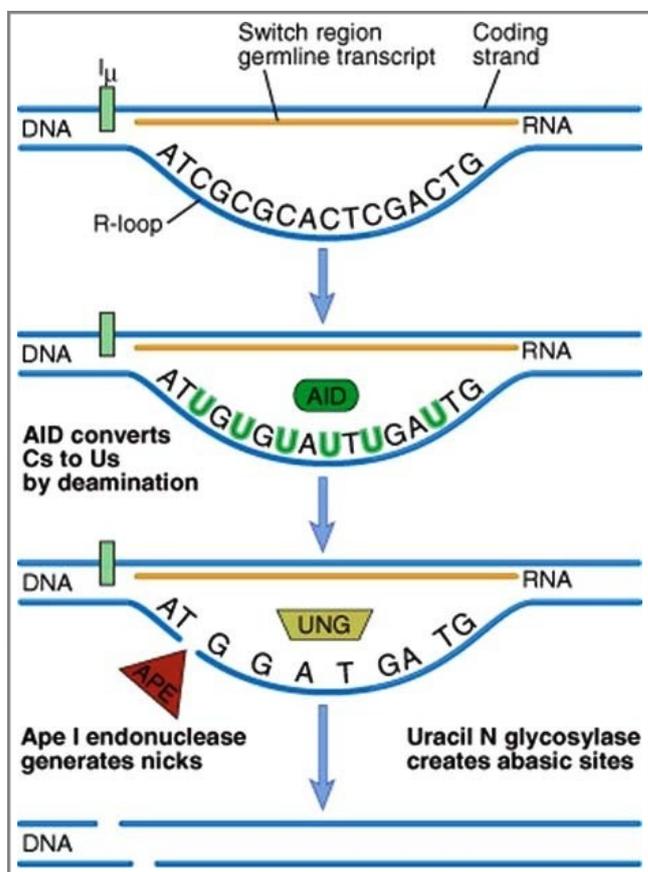
La Zona Chiara è ricca di FDC invece che con i prolungamenti avranno contatto con i linfociti B , che qui saranno concentrati in modo minore ; in questa zona avvengono gli eventi di selezione sui linfociti B .



5) Scambio isotipico della catena pesante

In risposta alle citochine una parte di Linfociti B attivati , che esprimono IgM e IgD di membrana , vanno incontro allo switch della catena pesante e quindi alla produzione di immunoglobuline di classi differenti . Questa fase si svolge alla periferia dei follicoli e nei centri germinativi .

Le citochine in questo processo sono fondamentali e indicheranno quale tipo di catena verrà selezionata , ad esempio la IL-4 induce la trascrizione dei geni per le catene epsilon e quindi indicano la produzione di IgE , mentre l'IFN-gamma induce la produzione di IgG2a ; non solo le citochine inducono lo switch , ma sono anche altri i fattori che lo influenzano ; un fattore può



essere il distretto anatomico in cui i linfociti B risiedono, ad esempio nel MALT sappiamo che c'è una maggiore quantità di IgA rispetto alla norma e quindi viene preferenzialmente prodotta IgA (lo scambio di IgA è stimolato dal TGF-beta (Transforming Growth Factor), prodotti da molti tipi di cellule nelle mucose, TACI appartiene alla famiglia dei recettori per il TNF e svolge un ruolo per le IgA perché riconosce il TGF-beta (un deficit di TACI porta al deficit selettivo di IgA, una Ipogammaglobulinemia).

Un'influenza ce l'ha anche il tipo di microrganismo che stimola la risposta; infatti vediamo che un determinato patogeno induce preferenzialmente produzione di una particolare classe di anticorpo; vediamo i batteri capsulati che sono ricchi di polisaccaridi evocano la produzione di IgM, che si lega al batterio e attiva il

complemento e induce la fagocitosi del microrganismo opsonizzato; poi vediamo virus e batteri che inducono la produzione di IgG (70-75% dei totali anticorpi) che infatti neutralizza virus e batteri; infine i parassiti inducono IgE (soprattutto gli elminti).

Risulta evidente come gli T helper secernano in risposta a diversi microrganismi differenti citochine in grado di indirizzare lo switch isotipico lo fanno attraverso l'interazione CD40-CD40L.

L'influenza maggiore ce l'ha quindi il **CD40L** prodotto dai linfociti T helper attivati e riconosciuto dai Linfociti B attraverso il recettore CD40; questa è l'interazione fondamentale dello sviluppo B a nella risposta T-dipendente. CD40 infatti attiva questo enzima **AID** (Activation-Induced Deaminase), che è presente a valle del recettore CD40 e che è un enzima chiave dello switch isotipico.

Il segmento già riarrangiato specifico per un determinato antigene è il segmento VDJ; questo segmento durante il meccanismo, chiamato ricombinazione per scambio, viene ad essere associato ai segmenti costanti dei vari isotipi di anticorpi; il segmento VDJ si ricombina quindi con un segmento C (sempre casualmente) posto più a valle e il DNA interposto exciso ed eliminato.

A monte di ogni regione di scambio è presente una regione, o esone iniziatore I, preceduto da una regione promoter. Questa regione sarà riconosciuta dall'enzima chiave di questo processo AID, che è stato attivato dall'interazione CD40-CD40L. Inoltre le citochine identificheranno per una regione costante o per un'altra. L'enzima AID agisce a livello delle catene di stampo DNA a singola catena, chiamate regioni di scambio S, andando all'interno di queste a **catalizzare la deaminazione**

delle citosine e convertendole con uracile ; la sequenza riconosciuta sarà ricca di GC e quindi vengono generati numerosi nucleotidi di uracile ; questi residui di uracile vengono riconosciuti da un secondo enzima , **UNG** o **uracil N-glucosilasi** , il quale si legherà a questi punti e andrà a rimuovere gli uracili , producendo di fatto siti privi di basi azotate ; un terzo enzima , o **endonucleasi Ape-1** , riconosce questi siti lasciati liberi e catalizzerà il taglio enzimatico , generando delle rotture sulla doppia catena di DNA ; ciò promuoverà l'eliminazione della sequenza compresa e la saldatura delle due terminazioni libere attraverso un apparato chiamato "di riparazione delle rotture della doppia elica" . Deficit ai geni che codificano per AID e UNG portano a sindromi di Ipergammaglobulinemia (IperIgM) .

6) Maturazione dell'affinità

Questo è un altro processo importantissimo , che porta alla sopravvivenza di quei linfociti B che produrranno gli anticorpi con l'affinità maggiore , solamente di quegli anticorpi che avranno la capacità maggiore di legare l'antigene ; è necessaria l'interazione del CD40 col rispettivo ligando e quindi la maturazione può avvenire solamente nel corso di risposte T-dipendenti .

Nei linfociti B proliferanti della zona scura quindi si osserva un'elevata frequenza di mutazioni puntiformi a carico dei geni V che codificano per le Ig ; infatti se per lo switch era la catena pesante ad essere interessata e più in particolare le regioni costanti , qui interessa la porzione variabile , perché la maturazione dell'anticorpo che già è specifico per l'antigene corrisponde alla ricerca di un legame perfetto , la ricerca della perfezione .

Si stima che per ogni divisione cellulare la frequenza di mutazioni sia pari a 1 ogni 10^3 paia di basi del gene V ; questa frequenza è maggiore di circa 10^{3-4} volte nelle regioni V che in qualsiasi altro gene di mammifero e per questa ragione è anche definita **ipermutazione somatica** .

Ciascun clone B specifico per un determinato antigene accumulerà sempre più mutazioni durante la propria permanenza nel centro germinativo (ricordiamo che il centro germinativo si genera in risposta ad un contatto con il linfocita T nelle zone di giunzione tra aree T e aree B , quindi il linfocita B è già specifico per quell'antigene) ; evidenze dimostrano che le ipermutazioni si verificano maggiormente nelle regioni CDR e che avvengono più mutazioni nelle IgG che nelle IgM ; inoltre la presenza di mutazioni correla con l'aumento dell'affinità degli anticorpi diretti contro l'antigene che ha originato la risposta . Ricordiamo che queste mutazioni sono casuali , quindi possono generarsi anche cloni non utili , ma sono pochissimi , visto che il linfocita è già specifico , ma si cerca la perfezione .

Le mutazioni somatiche si verificano nella zona scura nei centroblasti , che contengono nel nucleo quindi l'AID e al termine migrano nella zona chiara dove si differenziano in centrociti , vengono selezionati dalle FDC e possono andare incontro a ulteriore scambio isotipico

I Linfociti B che hanno subito ipermutazione si dirigono nella zona chiara dove avviene la fase finale della loro maturazione e dove sono presenti maggiormente FDC che presentano l'antigene ; qui solamente i linfociti B che sono in grado di riconoscere l'antigene sopravvivono , altrimenti vanno incontro a morte apoptotica ; i linfociti B che passano la selezione e legano con maggiore affinità , divengono il bersaglio maggiore delle citochine prodotte dai linfociti T helper ; a mano a mano che la risposta si sviluppa , vengono prodotti più anticorpi e sempre meno antigeni in compenso ; questo induce una competizione tra i linfociti B , cosicché sopravviveranno solamente i "perfetti" o simil-perfetti .

Il Risultato della selezione nei centri germinativi durante la risposta anticorpale è la creazione di una sempre maggiore affinità per quell'antigene stesso .

Alla fine le cellule fuoriescono poi dal centro germinativo trasformandosi in linfociti B di memoria o in plasmacellule .

7) Differenziazione dei linfociti B in plasmacellule

Una parte di quei linfociti come detto diventa plasmacellule , una cellula deputata a fare una cosa solamente : produrre anticorpi . Questa cellula ha un nucleo caratteristico , con la cromatina organizzata come i raggi di una ruota di un carro ed è stipata di reticolo granulare , a denotare proprio la funzione di intensa sintesi proteica . Le plasmacellule originano quindi dai linfociti B attivati da BCR , TLR , CD40 e i recettori per le citochine .

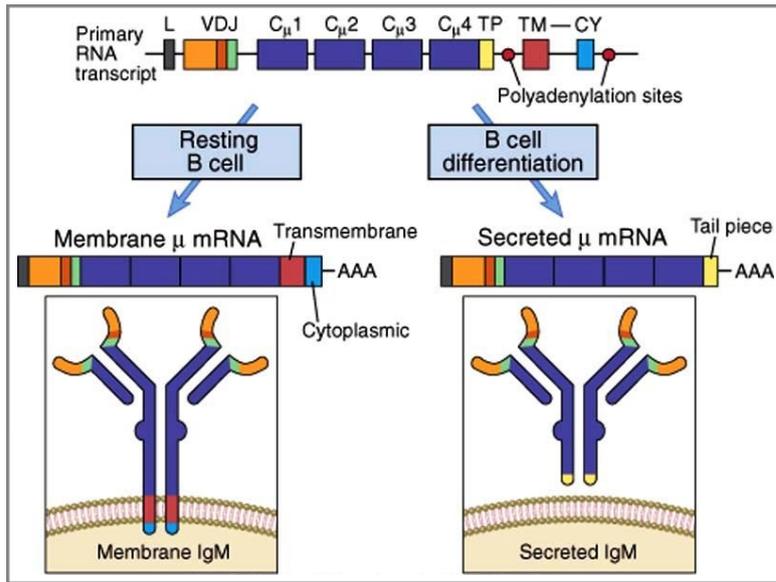
La produzione di plasmacellule dipende fortemente da un fattore di trascrizione chiamato **BLIMP-1** che dirige il processo di differenziazione .

Esistono due tipi principali di plasmacellule : a vita breve e a lunga sopravvivenza .

Le plasmacellula a vita breve vengono prodotte nelle risposte T-indipendenti e nelle fasi precoci delle risposte T-dipendenti ; queste si riscontrano generalmente negli organi linfoidi secondari e organi non linfoidi periferici .

La plasmacellula a lunga sopravvivenza invece viene prodotta nelle fasi più avanzate della T-dipendente durante la reazione del centro germinativo , dove acquisiscono la capacità di migrare verso il midollo osseo e dove vengono in esso immobilizzate da un recettore della famiglia BAFF , il recettore **BCMA** , che come ruolo ha quello di immobilizzare le plasmacellule nel midollo osseo ; a due tre settimane dall'immunizzazione con un antigene T-dipendente il midollo osseo può

rappresentare quindi la sede principale di produzione di anticorpi , e queste plasmacellule possono continuare a secernere per mesi , anche anni e saranno quelli che forniranno un'immunizzazione immediata nel caso di una riesposizione dell'antigene .



Il processo di differenziazione di cellule B in cellule effettrici può portare queste cellule produrre delle Ig che normalmente sono esposte in membrana . Ciascun linfocita può sintetizzare sia IgM di membrana che IgM in forma secreta . Strutturalmente le IgM di membrana hanno nella porzione C-Terminale dopo il quarto dominio costante , un residuo idrofobico di circa 26 aminoacidi che sarà

responsabile del legame con la membrana appunto e questi sono seguiti da una coda di soli tre aminoacidi (lisina, valina, lisina) ; le IgM secrete invece mancheranno di tale sequenza transmembrana idrofobica , ma in compenso avranno una coda citoplasmatica più lunga , di circa 20 aminoacidi fortemente polari . Lo splicing alternativo è quel processo che porta alla generazione di una forma di IgM alternativa . Se gli esoni che codificano per la porzione transmembrana rimangono inclusi nel processo di taglio enzimatico , allora si formerà di membrana , mentre se non rimarranno inclusi si formerà in forma secreta . Lo splicing è regolato dal clivaggio dell'RNA e dai siti di poliadenilazione . Purtroppo il processo che chiarisce il perché avvenga una forma o un'altra non si conosce ; tuttavia è evidente che mano a mano che la risposta continua , vengono prodotte in percentuale più forme secrete che forme di membrana , anche se potenzialmente le possibilità di ciascuno è di 50% ; le IgD invece esistono praticamente solo in forma di membrana , mentre sono molto rare le forme secrete (anche qui potenzialmente sono 50% le possibilità di esistere in forma di membrana o in forma secreta) .

8) Generazione di linfociti B di memoria e risposte secondarie

Alcuni linfociti B invece che diventare plasmacellule , diventano delle cellule di memoria , che saranno fondamentali per le risposte secondarie , quindi nelle risposte verso un antigene già incontrato e daranno una risposta massiva più efficiente in tempi minori e anche migliore a livello qualitativo . Sopravvivono per grandi periodi ; alcune rimarranno nei centri germinativi , mentre altre possono ricircolare tra sangue e linfa . Questi linfociti di memoria esprimono BCR ad alta affinità (perché ipermutati) e isotipi diversi dalle IgM (perché hanno subito scambio isotipico) .

Risposte Anticorpali agli antigeni T-Indipendenti

Molti antigeni non proteici attivano la risposta specifica anche senza la stimolazione degli T helper e per questo vengono indicati come antigeni T-indipendenti . Gli anticorpi prodotti nelle Indipendenti sono generalmente caratterizzati da una bassa affinità e sono rappresentati da IgM e con un modesto numero di IgG , che invece sono il numero predominante .

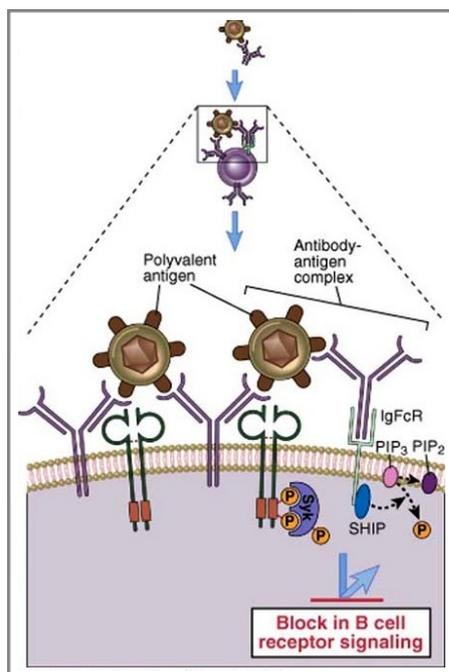
Individuiamo due tipi principali di antigeni T-Indipendenti : il primo è l'LPS . Questo è importante perché avrà effetti diversi a seconda delle concentrazioni , infatti vediamo che in grandi concentrazioni potrà avere un'attivazione poli-clonale , cioè andrà a portare a maturazione i linfociti B senza una particolare restrizione , verranno attivati i linfociti B a produrre tutti i tipi di anticorpi con diverse specificità ed è una funzione unica di questo antigene . Quando è presente in concentrazioni minori andrà invece ad indurre una risposta più specifica (IgG) . Questo LPS potrà attivare sia B immature che mature .

Il secondo antigene è il Polisucrosio , un polisaccaride della capsula batterica che attiva le cellule B mature .

Queste risposte possono verificarsi in particolari sedi anatomiche dei tessuti linfoidei , in particolare al livello della milza e del midollo osseo . I Linfociti B della zona marginale rappresentano una sottopopolazione di B che risponde principalmente a polisaccaridi ; i Linfociti B-1 pure rispondono velocemente a TI . Molti polisaccarici che compongono la parete cellulare dei batteri appartengono a questa categoria . TI contribuiscono a stimolare la produzione di anticorpi nucleari , presenti fisiologicamente in circolo e prodotti senza apparente esposizione all'antigene .

Feedback anticorpale : regolazione delle risposte immunitarie umorali da parte dei recettori per FC

Gli anticorpi secreti formano immunocomplessi che vanno ad occupare simultaneamente sia Ig di membrana , sia i recettori Fc-gamma sulla superficie dei linfociti B specifici , **inibendone** l'attivazione . Questo fenomeno è detto feedback anticorpale e quindi consiste nell'inibizione , da parte delle IgG secrete , della sintesi di anticorpi . Questa cosa è molto importante ; le IgG secrete possono legarsi a un recettore per le Fc delle IgG chiamato CD32 Fc-gamma-R-II sul linfocita B (anche NK) . Il dominio citoplasmatico di questo recettore contiene un motivo detto **ITIM** di 6 aminoacidi ,



rispettivamente isoleucina-X-tirosina-X-X-leucina . Quando il recettore Fc-gamma del linfocita B viene legato all'immunocomplesso , ITIM viene fosforilato nelle tirosine formando un sito di attacco per domini SH2 presenti su SHIP (inositolo 5-fosfatasi) che idrolizza un gruppo fosfato su PIP3 e attraverso questo meccanismo blocca la risposta dei linfociti B .

Questo è un meccanismo fisiologico di controllo delle risposte immunitarie umorali poiché è direttamente stimolato dalla produzione di anticorpi , bloccandone l'ulteriore produzione . Gli anticorpi poi , come sappiamo , possono amplificare anche la stessa produzione legandosi al complemento .

Linfociti B esprimono anche un altro recettore inibitorio , che lega l'acido sialico , CD22 .

Capitolo 11

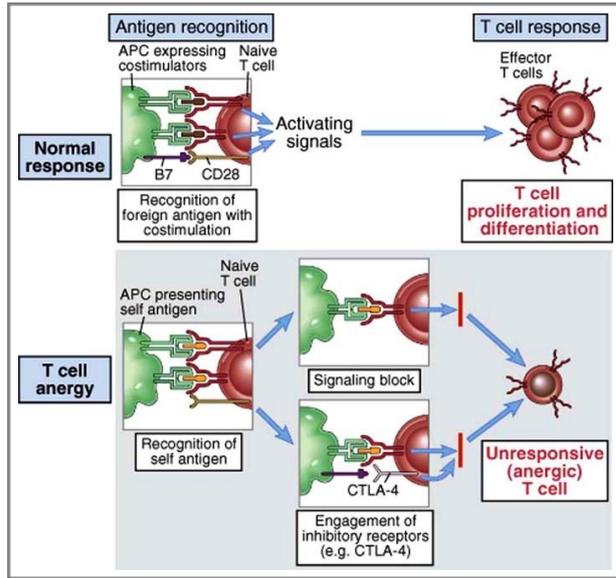
Tolleranza Immunologica

Per definizione è la mancata risposta ad un antigene , indotta da una precedente esposizione allo stesso antigene . Quando i linfociti incontrano l'antigene , possono attivarsi e rispondere oppure possono inattivarsi o essere eliminati ed allora si parlerà di tolleranza immunologica . Gli antigeni che danno luogo alla tolleranza vengono definiti **tollerogeni** (per distinguerli dagli immunogeni) .

La tolleranza agli antigeni self è detta tolleranza al self ed è una priorità dell'individuo umano , infatti gli individui normali , com'è giusto che sia , sono tolleranti verso i propri antigeni e quei linfociti che riconoscono il self vengono uccisi , inattivati oppure mandati a modificare la propria specificità antigenica ; altrimenti si andrebbe incontro a fenomeni di autoimmunità , malattie autoimmuni , dove si sviluppano risposte verso gli antigeni autologhi .

Caratteristiche Generali e meccanismi della tolleranza immunologica

La tolleranza origina dal riconoscimento specifico degli antigeni da parte di linfociti specifici . La tolleranza self può essere indotta nei linfociti autoreattivi immaturi negli organi linfoidi primari nella tolleranza centrale , oppure nei linfociti maturi presenti nei siti periferici nella tolleranza periferica .



L'interazione di linfociti immaturi con antigeni self determina risposte diverse, che portano o alla delezione del clone con l'apoptosi; le cellule B possono subire editing recettoriale, quindi cambiare la specificità del recettore e se non succede, apoptosi; inoltre CD4+ possono diventare T regolatori che migrano nella periferia e prevengono le risposte al self. Esistono due tipi di tolleranza, una Centrale e una periferica. La centrale per definizione è la selezione dei linfociti immaturi negli organi linfoidi centrali. La periferica è il controllo dei linfociti maturi negli organi periferici.

Tolleranza dei Linfociti T

- Tolleranza centrale

Molte cellule T immature che riconoscono l'antigene con elevata affinità vengono uccise; nel timo, che è l'organo di maturazione dei linfociti T, vengono espressi tre tipi di antigeni: gli antigeni propri del timo, antigeni ubiquitari, quindi comuni a tutti i tessuti e poi antigeni tessuto-specifici. Questi tre tipi saranno quasi tutte le proteine che il linfocita incontrerà nell'arco della sua emivita, e quelle proteine tessuto-specifiche sono espresse grazie ad un gene AIRE che specifica per un fattore di trascrizione omonimo, il quale stimola l'espressione di queste proteine tipicamente self; succede perché il riconoscimento del self con grande affinità porta un forte segnale dal recettore che induce apoptosi. Ce ne saranno alcune che riconoscono queste proteine ed allora verranno eliminate e possono essere sia doppio positive nella corticale, che singolo positive nella midollare; una mutazione del gene AIRE porta alla sindrome poliendocrina autoimmune, APS, caratterizzata da danni a diversi organi endocrini, come paratiroidi, surrenali e isole pancreatiche, ad opera di linfociti T autoreattivi, perché non hanno subito un processo maturativo adeguato; topi con mutazione nella proteina Zap-70, sviluppano patologie autoimmuni.

Alcune CD4+ positive che incontrano il self nel timo non vengono eliminate, ma si differenziano invece in T regolatorie come detto precedentemente, le quali escono dal timo e svolgono la funzione di inibire le risposte immunitarie dirette contro i tessuti self in periferia.

- Tolleranza periferica si svolge con tre meccanismi:

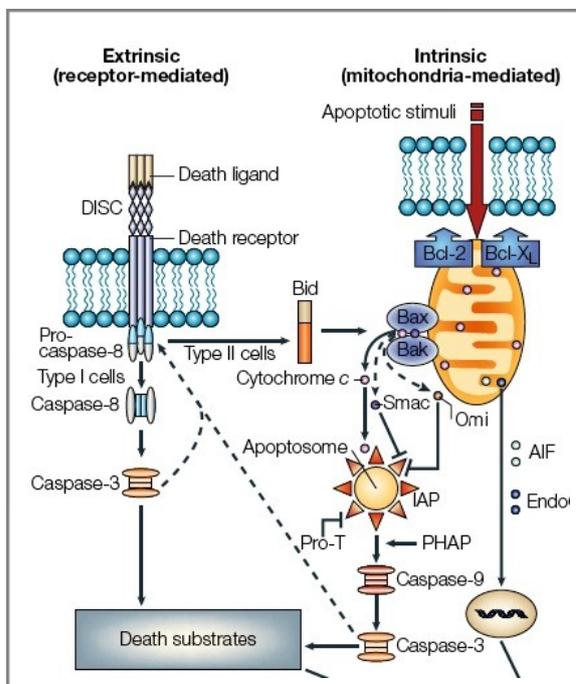
- 1) **Anergia**: L'esposizione dei CD4+ a un antigene, in assenza di molecole costimolatorie, o la mancanza di attivazione dell'immunità innata, rende questi linfociti incapaci di rispondere all'antigene; questo perché non giunge il secondo segnale e una prolungata attivazione del primo segnale porta ad anergia, quindi ad una non responsività all'antigene, una mancanza di risposta,

diventano incapaci di rispondere all'antigene ; l'anergia mostra un blocco della trasduzione del segnale del TCR ; il riconoscimento di antigeni self inoltre può attivare delle ligasi che possono ubiquitinare le proteine associate al TCR e indirizzarle alla degradazione quindi si perdono molecole coinvolte nella trasduzione ed il risultato sarà anergia ; cellule T che riconoscono antigeni self possono reclutare recettori inibitori del CD28 come CTLA-4 e PD-1 , il primo compete con il recettore per B7 e il secondo riconosce due ligandi sulle APC e inattiva le cellule T . Le cellule dendritiche presentano continuamente antigeni self alle cellule T quando sono a riposo , quando non ci sta un'infezione in atto e quindi non presentano sulla loro superficie quei segnali attivatori per le cellule effettrici , ma ci sono T che riconoscono comunque l'antigene , allora diventano anergiche ; si pensa quindi che le DC possano avere funzioni tollerogeniche .

2) Inibizione dei linfociti T autoreattivi da parte dei **T Reg** : queste cellule nascono dalle CD4+ che riconoscono il self ed esprimono caratteristicamente sulla membrana la catena alfa del recettore dell'IL-2 (CD25) infatti sono chiamate **CD4+CD25+** ; vengono generate nel timo e sono T Reg Naturali , ma anche in periferia come i linfonodi e sono chiamati T Reg Inducibili ; la loro sopravvivenza è regolata da citochine come TGF-beta e IL-2 e dall'interazione B7:CD28 anche se non è molto chiaro come si sviluppino queste cellule ; Un fattore trascrizionale importante è **FoxP3** che svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e funzione di queste cellule , infatti topi knockout o con mutazioni a carico di questo gene , sviluppano una sindrome autoimmune associata all'assenza di cellule T regolatorie CD25+ e nell'uomo si ritiene sia responsabile di una poliendocrinopatia chiamata **IPEX** (Immune Dysregulation , Polyendocrinopathy , Enteropathy , X-linked syndrome) ; topi knockout per IL-2 o per la catena alfa del recettore portano sindromi autoimmuni ; le regolatorie sono dal punto di vista terapeutico molto studiate , in quanto possono controllare le risposte immunitarie . (vedi meglio nel capitolo 13)

3) **Delezione** dei linfociti T per morte cellulare : I linfociti T possono morire per apoptosi in due differenti vie : La prima è la via secondo cui un linfocita T che riconosce un antigene self senza una infiammazione quindi senza segnali costimolatori ; in questa via viene attivata una proteina pro-apoptotica chiamata **Bim** della famiglia Bcl-2 , la quale viene attivata dal riconoscimento antigenico senza costimolazione o in assenza di fattori di crescita e viene attivata perché in mancanza di infiammazione , non vengono inviati segnali dal TCR di sopravvivenza cellulare , quei segnali anti-apoptotici fondamentali per il prosieguo della risposta ; viene lasciata indisturbata e porta ad apoptosi . La seconda via invece è causata da una ripetuta attivazione del linfocita T CD4+ allo stesso antigene e questo meccanismo porta all'espressione da parte del T stesso di un ligando , il ligando di Fas , per il quale ha anche il recettore **Fas** , appunto , che provoca l'attivazione di una cascata di proteasi cisteiniche o **caspasi** .

[Approfondimento sull'**apoptosi** : A livello macroscopico si osserva la condensazione della cromatina , la disorganizzazione del nucleo , la contrazione del citoplasma e la comparsa di



rigonfiamenti della membrana plasmatica , infatti sono tipicamente frammentate in corpuscoli , chiamati corpi apoptotici , riconosciuti ed eliminati dai macrofagi .

Apoptosi significa "morte cellulare programmata" . Può essere causata da un danno al DNA , da stress cellulare , da una deprivazione di fattori di crescita e da attivazione di recettori di membrana particolari ; la morte programmata svolge un ruolo fondamentale .

Esistono due vie principali per attivare l'apoptosi :

1) La VIA MITOCONDRIALE e della famiglia Bcl-2 :
Intrinseca

Il principale meccanismo di apoptosi coinvolge la famiglia di Bcl-2 ; queste sono divise in :

- Proteine anti-apoptotiche (Bcl-2 , Bcl-X e Mcl-1) danno stabilità alla membrana mitocondriale esterna
- Proteine pro-apoptotiche (Bax , Bid e Bak) che alterano l'integrità della membrana esterna
- Proteine a singolo dominio BH-3 , che funzionano sia come pro- che anti-apoptotiche

Le proteine a singolo dominio BH-3 nello sviluppo dei linfociti B e T sono molto importanti , perché Bim fa parte di questa sottofamiglia . Le BH-3 possono legarsi alle proteine pro-apoptotiche Bak e Bax nel caso di alterata permeabilità della membrana generando un aumento di questa permeabilità , oppure possono inibire Bcl-2 e Bcl-X prevenendo l'interazione di queste con Bak e Bax ; la perdita dell'integrità della membrana ha come conseguenza il rilascio dei più importanti induttori di apoptosi , quali : il citocromo c , Smac/Diablo e Omi/HtrA2 (anche AIF e Endonucleasi G - DNasi) . Il citocromo c si lega ad Apaf-1 (fattore di attivazione dell'apoptosi-1) formando il complesso chiamato apoptosoma , che va a legare ed attivare la procaspasi-9 che a sua volta attiva la caspasi-9 e la via dell'apoptosi . Le caspasi che poi sono responsabili delle fasi finali della morte cellulare sono tenute a freno da altre proteine , che sono inibitorie , come IAP (inibitore dell'apoptosi) ; Smac/Diablo e Omi/HtrA2 legano e antagonizzano l'attività delle IAP , quindi le caspasi sono attivate e libere di svolgere la loro funzione effettrice , che porta la cellula alla morte .

2) La VIA MEDIATA DAI RECETTORI DI MORTE : Estrinseca

I recettori sono appartenenti alla famiglia dei TNF ; riconosciamo Fas che con il suo ligando può indurre apoptosi . La porzione intracellulare di Fas contiene un dominio chiamato dominio di morte che si associa ad una proteina anch'essa contenente questo dominio , chiamata FADD (Fas-

Associated Death Domain) . Questa interazione permette a Fas di associarsi alla procaspasi-8 che taglia la caspasi 8 e induce il suo processo apoptotico .

Le caspasi (cisteina proteasi che tagliano proteine immediatamente dopo residui di **aspartato**) , sono enzimi latenti che una volta attivati inducono il processo apoptotico ; tutte possiedono un dominio QACRG . Ci sono caspasi iniziatrici che tagliano e attivano caspasi esecutrici comuni alle diverse vie di attivazione dell'apoptosi .] (vi consiglio di vedere molto bene l'apoptosi che Testi è fissato)

Tolleranza dei Linfociti B

Questa tolleranza è necessaria per mantenere la non-responsività agli antigeni self timo-indipendenti , quali polisaccaridi e lipidi ; può svolgere anche un ruolo nella prevenzione delle risposte anticorpali verso antigeni proteici .

- Tolleranza centrale B (editing recettoriale)

Le cellule B immature che riconoscono l'antigene attraverso l'IgM di membrana con elevata affinità cercano di acquisire una nuova specificità attraverso editing recettoriale , quindi viene riarrangiata nuovamente la catena leggera , ma se ciò non porta a risultati positivi , i linfociti B immaturi muoiono per apoptosi . Nuovo riarrangiamento della catena leggera positivo , allora potrà migrare in periferia e matura . Hanno questa seconda occasione che ai linfociti T non è permessa .

- Tolleranza periferica B (esclusione follicolare)

I linfociti B maturi che riconoscono antigeni self nei tessuti periferici in assenza delle cellule T helper specifiche possono essere inattivati o eliminati per apoptosi ; linfociti B maturi autoreattivi perdono la capacità di migrare nei follicoli perché l'esposizione cronica ad un antigene determina una riduzione di CXCR5 e quindi non riescono a trovare la via dei follicoli , fenomeno chiamato esclusione follicolare , quindi non ricevono adeguati segnali di sopravvivenza e muoiono . L'incontro con un linfocita B anergico con un T helper determina la loro morte mediata da FasL espresso dai T . CD22 inoltre è una fosfatasi importante nella tolleranza B e possiede un dominio ITIM .

Omeostasi del SI : Declino della Risposta Immunitaria

Il mantenimento costante del numero di cellule del SI è detto **omeostasi** . Le risposte agli antigeni sono autolimitate e si esauriscono a mano a mano che l'antigene viene eliminato , facendo tornare il SI allo stato di quiete ; quando l'antigene è eliminato c'è una fase di contrazione in cui la maggior parte delle cellule che hanno risposto all'antigene viene eliminata ; questi linfociti , privati della loro unica ragione di vita muoiono per apoptosi attraverso Bim e riduzione di fattori anti-apoptotici indotti dal BCR ; l'unico segno di avvenuta risposta è la persistenza delle cellule memoria .

Modulazione farmacologica

La rottura della tolleranza comporta risposte immunitarie dannose , come Ipersensibilità , Infiammazione o Autoimmunità e l'unica soluzione a questi problemi è l'immunosoppressione . Esistono tre categorie di farmaci ad azione immunosoppressiva e sono :

- Immunosoppressori Antinfiammatori (Corticosteroidi)
- Immunosoppressori Citotossici (Ciclofosfamide)
- Immunosoppressori Cellule T (Ciclosporina A e FK506)

1) I Corticosteroidi sono degli ormoni steroidei della famiglia dei glucocorticoidi , come il Prednisone , analogo sintetico del cortisolo . Il meccanismo di azione è l'alterazione dell'espressione genica (positiva o negativa) e bloccano l'infiammazione , ma produce effetti avversi , come la ritenzione idrica , l'aumento di peso , diabete e perdita di calcio osseo . (gli steroidi attraversano la membrana in modo passivo , perché apolari e vanno a legarsi a recettori intracellulari) I recettori steroidei si trovano nel citoplasma complessati con la proteina dello

Shock Termico 90 (Hsp90) ; il complesso steroide:recettore attraversa la membrana nucleare e nel nucleo potrà avere azione positiva , andando ad attivare la trascrizione genica , oppure negativa , andando ad inibire la trascrizione interagendo col fattore nucleare kB NFkB . I geni bersaglio sono quelli per le citochine pro-infiammatorie , enzimi pro-infiammatori e molecole di adesione .(img)

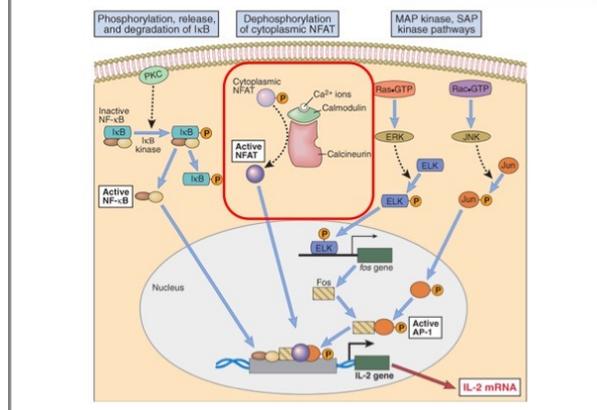
Terapia corticosteroidea	
Espressione genica	Effetti
↓ IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL,5	↓ Infiammazione indotta da citochine
↓ Ossido Nitrico Sintasi (NOS)	↓ Ossido Nitrico (NO)
↓ Fosfolipasi A2 ↓ Ciclossigenasi 2 ↑ Annexina-1	↓ Prostaglandine, Leucotrieni
↓ Molecole di adesione	Ridotta migrazione dei leucociti nei vasi
↑ Endonucleasi	Apoptosi di linfociti ed eosinofili

2) I farmaci immunosoppressori per linfociti T specifici sono sostanze derivate da batteri e funghi :

- CsA o Ciclosporina A , un decapeptide ciclico fungino
- FK506 (Tacrolimus) , un macrolide batterico
- Rapamicina (Sirolimus) , un macrolide batterico

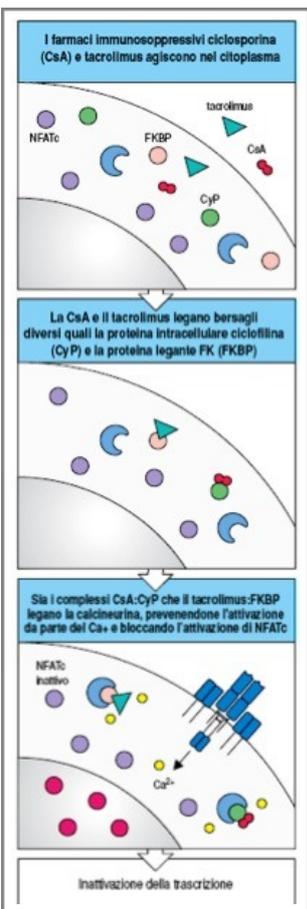
Come meccanismo di azione hanno quello di bloccare il segnale dal TCR , con conseguente blocco della proliferazione T .

➤ Inibizione della fosfatasi calcineurina

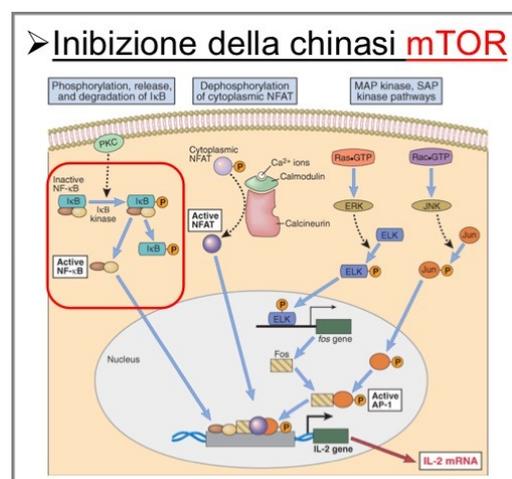
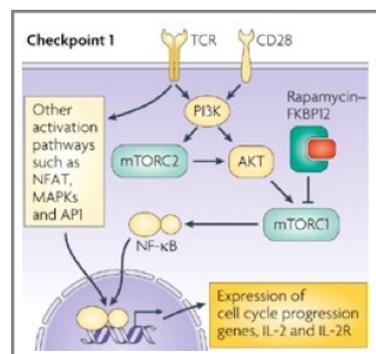


CsA e Tacrolimus, inibiscono la fosfatasi **calcineurina** che è fondamentale perché andrà a defosforilare il fattore di trascrizione **NFAT**, il quale si trova inattivato, fosforilato in serina. Questo di conseguenza non potrà legare le regioni promoter assieme al fattore AP-1 e la trascrizione verrà inibita.

La ciclosporina lega la ciclofilina o CyP, mentre Tacrolimus lega la immunofilina della famiglia FKBP. I due complessi formati legano la calcineurina e il fattore di trascrizione **NFAT** resta così inattivato dopo l'attivazione del segnale e quindi ci sarà blocco dell'espansione clonale T / me l'ha chiesta Condò all'orale, quindi vi consiglio di non saltare questo passaggio che è una sciocchezza infondo



La Rapamicina invece inibirà la chinasi mTOR. Questa andrà a legare sempre l'immunofilina della famiglia FKBP che lega la chinasi mTOR. Viene così bloccato il segnale della chinasi AKT attivata dal TCR e CD28. Qui **NFκB** resta inattivato e ci sarà blocco del ciclo cellulare e apoptosi delle cellule T.



Capitolo 12

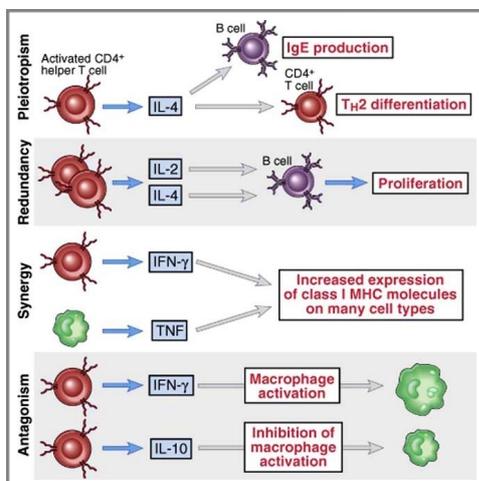
Citochine

Generalità

Le citochine sono proteine simil-ormone, prodotte dall'immunità innata e dall'immunità specifica, che regolano molte funzioni svolte dalle stesse cellule che le hanno prodotte e in grado di influenzarne delle altre che possederanno i recettori in grado di legarle. La loro produzione avviene durante la risposta ad un antigene estraneo; nella fase di attivazione andranno a stimolare la proliferazione e la differenziazione dei linfociti, mentre nella fase effettrice andranno ad attivare le cellule deputate all'eliminazione dell'antigene.

La nomenclatura è stata discussa a lungo. Inizialmente chiamate monochine e linfocine, perché si trovò che erano prodotte dai monociti e linfociti, ma ben presto si scoprì che venivano prodotte da molti tipi cellulari quali endoteliali e epiteliali, quindi venne scelto il nome di citochine per queste molecole per far capire che hanno origine cellulare (cito-) e che esercitano un'azione regolatoria autocrina e paracrina (chine); poiché molte citochine sono prodotte dai leucociti e che queste agiscono su loro stessi è stato coniato il termine interleuchine.

Le citochine non esistono all'interno della cellule impacchettate, pronte per essere secrete, ma la loro produzione è finemente regolata e la loro sintesi richiede la stimolazione dell'antigene e la conseguente trascrizione ex novo dei geni specifici che fino ad allora sono rimasti silenti; hanno una vita limitata e quando vengono prodotte generano delle risposte esplosive all'interno della risposta immunitaria.



Hanno delle caratteristiche quali il pleiotropismo per il fatto che le citochine possono agire su cellule di diverso tipo quindi a livello terapeutico possono produrre effetti benefici, ma anche effetti collaterali; un'altra caratteristica è la ridondanza, per il fatto che molte citochine diverse hanno lo stesso effetto; le citochine inoltre possono agire su altre citochine, antagonizzando gli effetti o agendo in sinergia, quindi aumentando l'effetto della citochina.

Le citochine possono agire a differenti livelli; la maggior parte viene prodotta in determinate sedi e sulle stesse cellule che le hanno prodotte avranno effetto, quindi si parlerà di stimolazione **autocrina**, mentre altre avranno effetto su cellule adiacenti e quindi si parla di stimolazione **paracrina**; quando una citochina viene

prodotta in grandi quantità può entrare in circolo e avere effetto a grandi distanza , quindi avrà azione **endocrina** (TNF) .

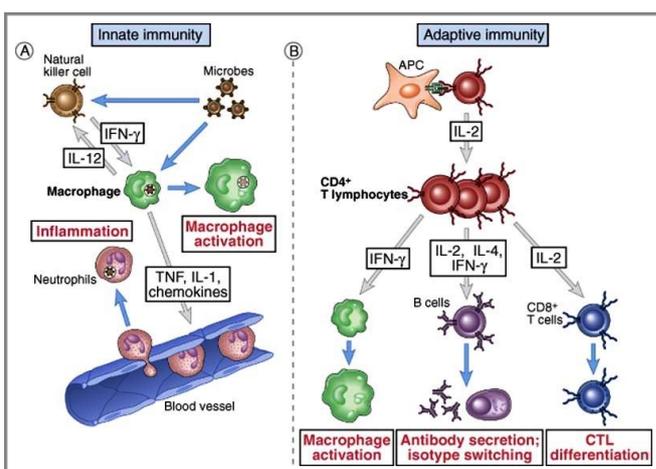
Le citochine vengono riconosciute da recettori specifici sulle cellule bersaglio , che andranno a legare la citochina con un'altissima affinità , infatti la costante di dissociazione è $10^{-10/12}$, molto alta (antigene-anticorpo $-7/11$ e peptide-MHC $-6/7$) ; una bassa concentrazione di citochine quindi riuscirà a legare i propri recettori .

I recettori per le citochine vengono espressi in risposta ad una stimolazione antigenica ; una volta espresso il recettore dal linfocito antigene-specifico , questi avranno una responsività nettamente maggiore rispetto agli altri linfociti , quindi questa è una caratteristica fondamentale per assicurare che proliferino solamente quei linfociti specifici per l'antigene , visto che le citochine non hanno alcuna specificità per l'antigene .

Le cellule che rispondono alle citochine acquisiranno nuove funzioni oppure prolifereranno , infatti i linfociti T proliferano , le cellule B subiscono scambio isotipico e i fagociti potenzieranno le loro azioni microbicide .

La risposta alle citochine porta all'espressione di fattori che possono inibire la loro azione , quindi viene regolata da fattori inibitori in un meccanismo di feedback negativo per limitarne la risposta ; possiamo vedere recettori inibitori che vengono attivati dopo la loro stimolazione , vediamo molecole che bloccano le chinasi nella via di trasduzione , vediamo molecole che bloccano l'azione dei bersagli delle chinasi e ancora più a valle del processo trasduttivo vediamo molecole che interferiscono fisicamente con i fattori di trascrizione per i geni da esprimere .

Possono essere classificate in base alla loro funzione :



1) Citochine che regolano l'immunità innata :

Vengono prodotte dai fagociti mononucleati in risposta agli antigeni infettivi riconosciuti dai TLR e vanno ad agire sulle cellule endoteliali per favorire la fuoriuscita delle cellule immunitarie dal circolo sanguigno e innescare e regolare le fasi precoci delle risposte .

2) Citochine che regolano l'immunità specifica :

Vengono prodotte dai linfociti T attivati in risposta al riconoscimento dell'antigene e quindi regolano le funzioni di proliferazione e di differenziazione nella fase di attivazione delle risposte T-dipendenti ; altre citochine regolano le funzioni delle cellule effettrici per l'eliminazione dell'antigene .

1. CITOCHINE CHE MEDIANO L'IMMUNITA' INNATA E L'INFIAMMAZIONE.

(IFN- α/β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-27, chemochine)

2. CITOCHINE CHE REGOLANO LA RISPOSTA IMMUNITARIA ACQUISITA.

(IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-16, IL-17, IFN- γ , LT, TGF- β)

3. CITOCHINE CHE STIMOLANO L'EMOPOIESI.

(ligando del c-kit, IL-3, IL-7, IL-9, MG-CSF, M-CSF, G-CSF)

3) Citochine che stimolano l'ematopoiesi :

Vengono prodotte dalle stromali del midollo osseo , dai leucociti e da altri tipi cellulari e stimolano la crescita e il differenziamento dei leucociti immaturi .

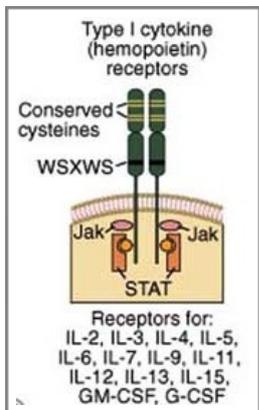
N.B. Queste classificazioni non sono assolute , perché una stessa citochina può agire sia nella regolazione innata che specifica .

-Recettori delle citochine e trasduzione del segnale :

Tutti i recettori per le citochine possiedono una porzione extracellulare per legare la citochina e una porzione intracellulare per legare chinasi e trasdurre o almeno avviare la trasduzione del segnale ; anche qui vediamo un'aggregazione di recettori per le citochine , indotta dal ligando . Possiamo classificare i recettori in base a delle omologie di sequenze nei loro domini , oppure in base alle loro funzioni , comunque li distinguiamo in

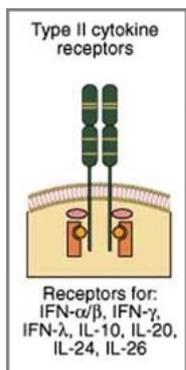
1) Recettori di tipo I :

Questi recettori nella loro regione più distale dalla membrana della porzione extracellulare possiedono una o due coppie di residui di cisteina , possiedono poi un dominio conservato WSXWS triptofano-serina-X-triptofano-serina ; riescono a legare le citochine di tipo I , quelle citochine che si ripiegano in quattro catene ad alfa-elica ; i residui aminoacidici che differiscono tra i recettori saranno responsabili delle diverse specificità per le citochine ; questi recettori avviano la trasduzione del segnale nella via di trasduzione Jak-STAT .



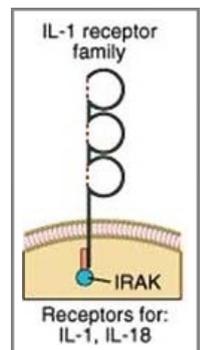
2) Recettori di tipo II :

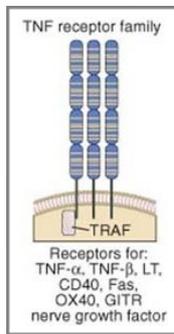
Questi recettori condividono con il I tipo i domini di cisteina , ma non condividono il dominio WSXWS e avviano la trasduzione della via Jak-STAT .



3) Recettori di IL-1 :

Questi recettori condividono il dominio TIR intracellulare dei Toll-Like Receptors ; possiedono un dominio Ig extracellulare ; attivano la trasduzione che avvia la trascrizione genica .

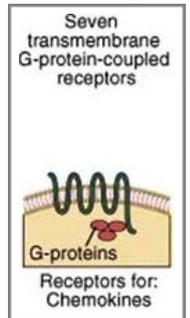




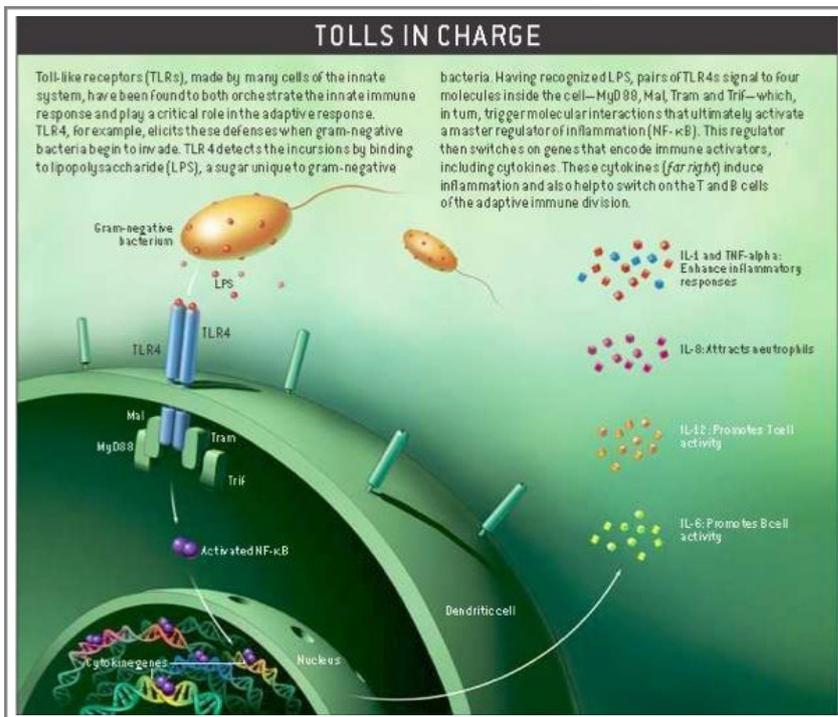
4) Recettori per il TNF :

Possiedono dei domini extracellulari conservati ricchi di cisteina e sono caratterizzati da vie di trasduzione del segnale comuni che modificano l'espressione genica e/o inducono l'apoptosi .

5) Recettori a Sette domini ad alfa-elica transmembrana :



Chiamati anche recettori accoppiati a proteine G , i quali sono coinvolti in numerosi processi cellulari , ma in campo immunitario mediano le risposte rapide e transitorie e chemochine ed altri mediatori dell'infiammazione .



Citochine che regolano l'immunità Innata

Le citochine dell'immunità innata sono prodotte durante le fasi precoci delle risposte immuni nei confronti dei

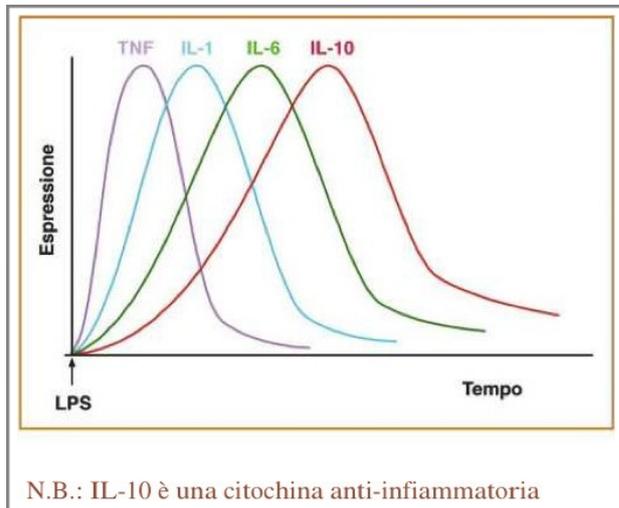
microorganismi e di altri antigeni e quindi durante le prime fasi dell'infiammazione ed hanno funzione di : 1) Regolare e Attivare le diverse funzioni dell'immunità innata e 2) Attivare la risposta acquisita .

L' Infiammazione è una complessa reazione del sistema immunitario innato , che induce una migrazione dei leucociti e delle proteine

plasmatiche nei focolai di infezione . La sua funzione primaria è protettiva , in quanto innesca la risposta immunitaria innata e contribuisce al controllo dell'infezione . In alcuni casi può causare dei danni ai tessuti e indurre una patologia .

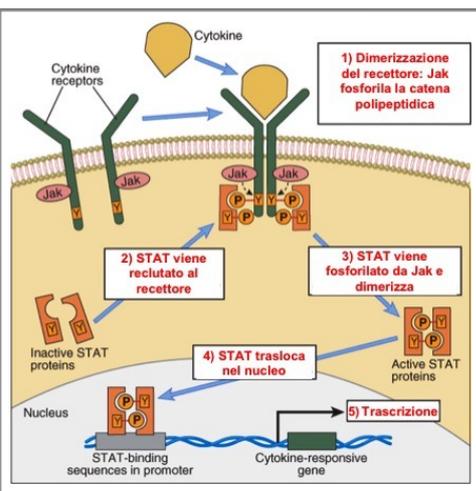
Le prime citochine che vengono prodotte sono:

- TNF- ;
 - IL-1
 - IL-6
 - chemochine
- } **Triade infiammatoria**



La risposta infiammatoria è innescata dai PRR , in particolare dai TLR .

Le prime citochine che vengono prodotte sono **TNF-alfa** , **IL-1** e **IL-6** che rappresentano la triade infiammatoria , oltre a chemochine e a IL-10 che come si può osservare dall'immagine è una citochina anti-infiammatoria . L'immagine mostra la cinetica di produzione delle citochine infiammatorie (TNF-alfa , IL-1 e IL-6) in risposta ad uno stimolo modello , come può essere un LPS .

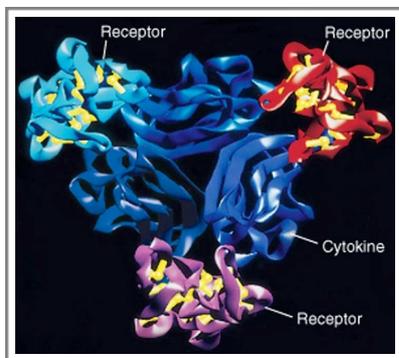


La via di trasduzione consiste nella dimerizzazione del recettore : Jak fosforila la catena polipeptidica ; STAT viene reclutato al recettore , viene fosforilato da Jak e dimerizza , così trasloca nel nucleo dove attiva la trascrizione genica .

- Fattore di necrosi tumorale , **TNF**

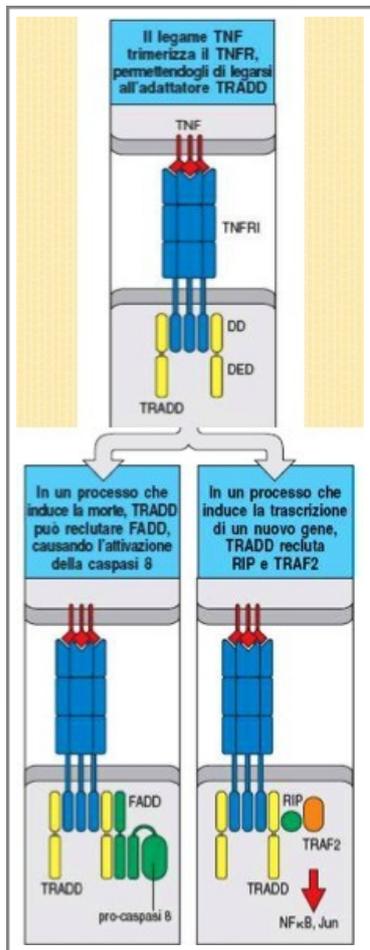
Il TNF è il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta ai batteri gram negativi e ad altri microrganismi patogeni ; è responsabile di molte complicanze sistemiche che possono insorgere nel corso dell'infiammazione ; può essere chiamato TNF-alfa per distinguerlo da TNF-Beta o linfotossina , una citochina strettamente correlata .

Produzione : La principale sorgente del TNF è costituita dai fagociti mononucleati attivati , ma anche T attivati , cellule NK e mastociti ; l'IFN-gamma prodotto da T e NK potenzia ulteriormente la sintesi di TNF da parte dei macrofagi .



Struttura : Nei macrofagi è una proteina di membrana con l'N-Terminale all'interno del citoplasma e la C-Terminale nell'ambiente extracellulare e su questa membrana viene espressa come un trimero in grado di legare un recettore per TNF (il secondo tipo) ; da ciascuna di questa una metalloproteasi stacca un polipeptide di 17 kD , tre di questi associati vanno a formare la forma di secrezione del TNF che quindi ha peso di 51 kD che assume una forma a piramide triangolare , con

ciascuna parete formata da una subunità . I siti di legame per il recettore sono alla base della



piramide , il che permette alla citochina di legare contemporaneamente tre recettori (del primo tipo) .

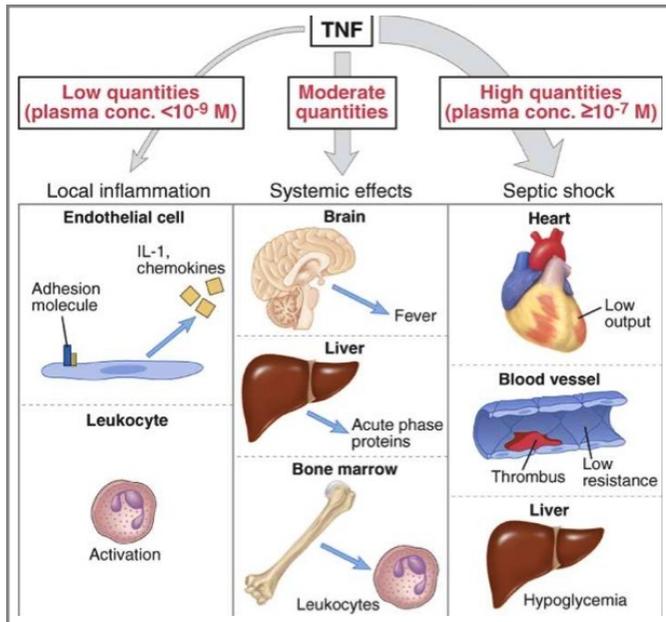
Recettori : Esistono due distinti recettori per il TNF ; il primo è di 55 kD definito recettore di tipo I (TNF-RI) , il secondo di 75 kD definito recettore di tipo II (TNF-RII) . L'affinità per TNF è bassa , $10^{-9}/10$ e vengono espressi sulla superficie di tutti i tipi cellulari .

La famiglia del TNF include proteine di membrana e citochine secrete che condividono delle sequenze , come l'organizzazione omotrimerica e la tendenza a ripiegarsi a piramide a tre lati , capovolta . Di questa famiglia fanno parte TNF-alfa , TNF-beta , RANK , FasL , CD40L . I recettori per queste citochine sono raggruppati nei TNF-R perché condividono nella porzione extracellulare la ricchezza di cisteina e soprattutto nel dominio intracellulare un **dominio di morte** , con il quale sulla base di un riconoscimento omotipico , legano proteine adattatrici che possono indurre la trasduzione del segnale ; della famiglia dei recettori fanno parte TNF-RI , TNF-RII , CD40 , Fas , il recettore per la linfofosina e il recettore per RANK . Sono particolari queste famiglie perché possono indurre due tipi di segnale , infatti possono sia attivare l'apoptosi , che

attivare la trascrizione genica . I secondi messaggeri che possiedono questo dominio di morte sono TRADD , FADD e RIP . Esiste un altro dominio coinvolto nella trasduzione , **TRAF** (sono 6 diversi) . L'evento comune è senz'altro il legame con una proteina adattatrice chiamata **TRADD** (dominio di morte per legare il recettore del TNF) , a questo punto TRADD può portare a due processi separati e distinti ; il primo processo vede questa proteina legarsi a **FADD** (dominio di morte della proteina associata a Fas) , che lega la pro-caspasi 8 che attiva la caspasi-8 e porta ad apoptosi ; il secondo processo , o via alternativa , vede TRADD legarsi a **TRAF-2**(TNF Receptor-Associated Factors) e **RIP-1**(proteina che interagisce col recettore) , che provocano la trascrizione di NF-kB e di AP-1 che sono pro-infiammatori , in quanto inducono la trascrizione genica . In un altro caso ancora vediamo che Fas lega direttamente FADD e induce l'apoptosi attivando la cascata apoptotica .

Attività Biologiche : La principale funzione del TNF è quella di reclutare e di attivare i neutrofilii e i monociti nel focolaio di infezione ; per fare ciò il TNF stimola l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali come le selectine favorendo dapprima l'ingresso dei neutrofilii e successivamente quello dei monociti e linfociti ; inoltre TNF stimola l'espressione delle chemochine che aumentano l'affinità delle integrine del leucocito per quelle molecole di adesione , permettendo di fatto la diapedesi .

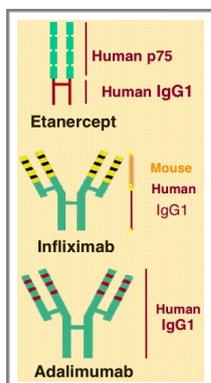
Nel corso di infezioni molto gravi TNF viene prodotto in grandi quantità , causando delle alterazioni anatomico-patologiche e cliniche-sistemiche :



- Sull'ipotalamo induce la febbre , quindi viene chiamato pirogeno endogeno , per distinguerlo dall' LPS chiamato pirogeno esogeno ; stimola le cellule ipotalamiche a sintetizzare prostaglandine e infatti inibitori delle prostaglandine come l'aspirina riducono efficacemente la febbre .

- Nel fegato agisce sugli epatociti aumentando la sintesi di proteine sieriche come , la proteina sierica amiloide A e il fibrinogeno ; le proteine plasmatiche prodotte dagli epatociti in risposta al TNF vengono definite proteine della fase acuta e svolgono funzioni fondamentali nella risposta di fase acuta agli stimoli infiammatori .

- La produzione prolungata di TNF causa un imponente danno al tessuto muscolare e adiposo chiamato cachessia , quindi un deperimento fisico causato dal mancato appetito indotto da TNF .
- Quando le concentrazioni di TNF superano 10^{-7} M , la contrattilità del miocardio e il tono della muscolatura vascolare vengono inibiti , causando caduta della pressione arteriosa e shock .
- TNF causa trombosi intravascolare agendo sull'endotelio e causando la perdita delle capacità anticoagulanti . Infatti agisce sulle cellule endoteliali stimolando la sintesi del fattore tissutale , che induce la coagulazione , ma allo stesso tempo inibisce l'espressione di trombomodulina , un potente inibitore del processo di coagulazione , quindi causa necrosi tumorale dovuta a danno indotto dalla trombosi .
- Porta gravi disturbi metabolici , infatti induce un'ipoglicemia non compatibile con la vita , dovuto ad un'utilizzazione eccessiva del glucosio , controbilanciata dall'incapacità del fegato di ripristinare normali valori del glucosio .

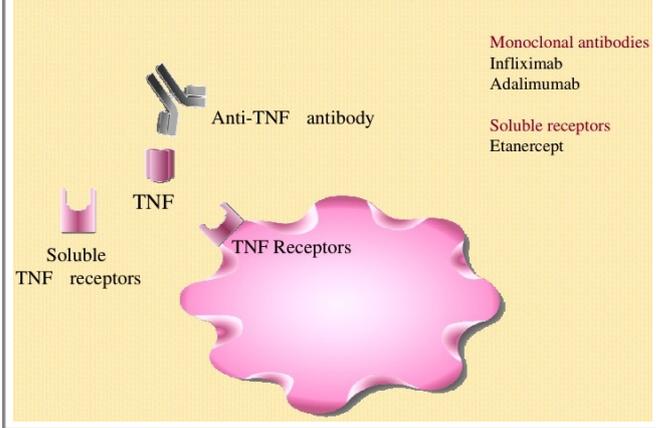


I batteri gram negativi inducono delle sepsi che quando sono più gravi portano a **shock settico** , caratterizzato da collasso cardiocircolatorio , coagulazione intravascolare disseminata e gravi alterazioni metaboliche ; è dovuto ad un'induzione da parte dell'LPS di un'abnorme produzione di TNF e di altre citochine quali IL-12 , IFN-gamma e IL-1 .

Esistono dei farmaci ad attività anti-TNF-alfa e questi sono :

- 1) **Etanercept** : Proteina di fusione del recettore umano p75 del TNFalfa con una frazione dell'Fc dell' IgG1 umana . E' inibitore competitivo del legame del TNF ai propri recettori cellulari .

Neutralization of TNF α



2) **Infliximab** : E' un anticorpo monoclonale chimerico IgG1 , umano-murino , che si lega con alta affinità sia alla forma solubile che quella transmembrana del TNFalfa , bloccando l'attività biologica .

3) **Adalimumab** : Anche questo è un anticorpo monoclonale ricombinante , ma completamente umano , specifico per TNFalfa . Si lega al TNFalfa con

elevata affinità e specificità , bloccando l'attività biologica della forma libera e di quella legata alla membrana .

- Interleuchina 1, IL-1

IL-1 ha la funzione di mediare le risposte infiammatorie attivate in seguito ad un'infezione o in seguito ad altri stimoli flogistici (in rapporto all'infezione) .

La principale sorgente di IL-1 sono i fagociti mononucleati attivati , ma può essere prodotta anche da cellule endoteliali ed epiteliali (diversamente dal TNF) .

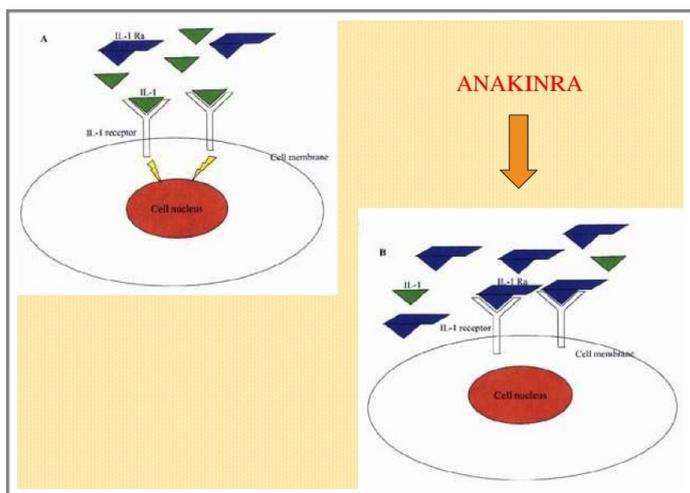
Esiste in due forme diverse , IL-1alfa e IL-1beta , che hanno un grado di omologia del 30% , ma che condividono gli stessi effetti biologici , legando gli stessi recettori ; sia la forma alfa che quella beta vengono sintetizzate come precursori di 33 kD e vengono secrete come proteine di 17 kD dopo la proteolisi parziale , solo che la forma alfa può anche essere attiva biologicamente senza subire il taglio proteolitico , mentre la forma beta necessita di questo processo enzimatico da parte di una caspasi , la proteina cisteinica caspasi-1 o **ICE** (caspasi-1 perché è stata la prima scoperta tra le caspasi) ; l'attivazione di questa caspasi-1 richiede l'assemblaggio dell'inflamosoma , un complesso di proteine di cui fa parte NALP , una famiglia di sensori citoplasmatici , infatti un aumento di NALP porta ad un aumento incontrollato di IL-1 e "sindromi infiammatorie" .

IL-1 riconosce il recettore per IL-1 e attiva come detto precedentemente la trascrizione genica per NF-kB e AP-1

- **Attività Biologiche** :

Ha effetti simili al TNF e la quantità prodotta determina la sua funzione , infatti una bassa concentrazione porta ad una mediazione locale , con aumento dell'espressione delle molecole di adesione sull'endotelio , mentre un'alta concentrazione porta sempre all'espressione delle selectine , ma anche alla produzione delle proteine di fase acuta dal fegato e porta anche a febbre (direttamente o indirettamente alla produzione di IL-6) .

I fagociti mononucleati producono un inibitore naturale dell'IL-1 , simile alla citochina e quindi in



grado di legarsi allo stesso recettore senza attivarlo e di conseguenza competere con IL-1 inibendolo , chiamato antagonista del recettore per IL-1 o **IL-1ra** . Inoltre è stato creato **ANAKINRA** , un anticorpo monoclonale , una forma ricombinatoria non glicosilata del recettore antagonista endogene , il quale va a legarsi ai recettori IL-1 e ne inibisce gli effetti pro-infiammatori (il nome è particolare in quanto è Anakin antagonista per il recettore dell'IL-1 ; il nome deriva dall'antagonista della serie Star Wars , in quanto il ricercatore era fan della serie!) ; questo

anticorpo viene utilizzato nel trattamento per l'artrite reumatoide giovanile . In alternativa la regolazione dell'IL-1 avviene anche attraverso l'espressione del recettore di tipo II che pure essendo in grado di legarlo , non induce quegli effetti biologici .

Produce altri effetti , come il rilascio di chemochine e la proliferazione di linfociti B e CD4+ .

- IL-6

E' il prototipo della citochina pleiotropica , infatti condivide delle sue funzioni con TNFalfa e IL-1 e fa assieme a loro parte della triade infiammatoria . Viene prodotta da fagociti mononucleati principalmente , ma anche da altre cellule come epatociti , astrociti , fibroblasti , T e B , monociti e cellule cancerose .

Ha un ruolo importante nella risposta di fase acuta , nell'emopoiesi e nella risposta innata e specifica .

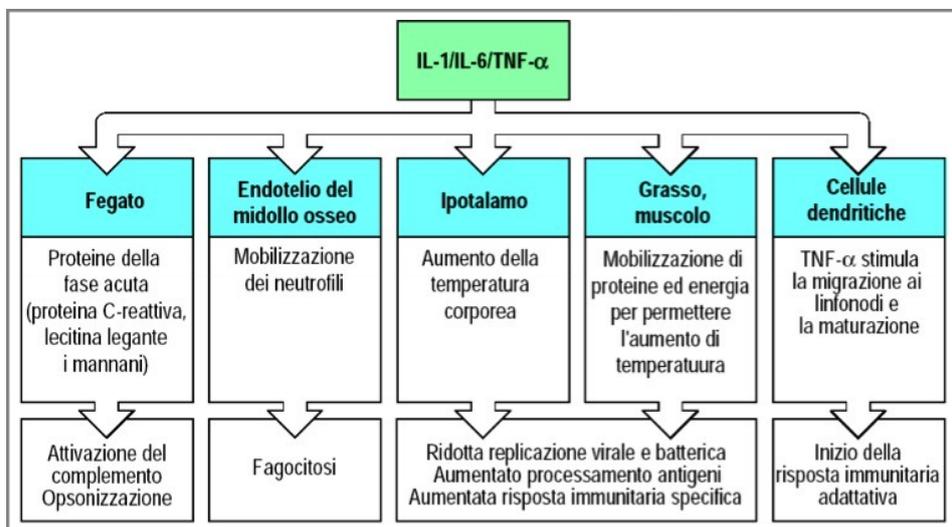
Come struttura , questa è un omodimero le cui subunità sono dotate di un dominio globulare a quattro alfa-eliche , quindi in grado di legare i recettori per le citochine di tipo I . La subunità responsabile della trasduzione del segnale è detta gp130 in virtù del peso molecolare e coinvolge Jak-STAT .

- Attività Biologiche :

Nell'immunità innata andrà a stimolare il fegato a produrre fibrinogeno , contribuendo quindi alla risposta di fase acuta . Induce febbre .

In ambito ematopoietico andrà a stimolare la crescita e differenziazione dei neutrofili in sinergia con IL-3 .

Nella specifica promuove la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule ; stimola la proliferazione di plasmacellule neoplastiche (mielomi) , le quali secernono questa citochina con effetto autocrino (per questa capacità viene usata per gli anticorpi monoclonali) promuovendo così la crescita di ibridomi ; infine promuove le reazioni cellulo-mediate attraverso l'induzione di citochine pro-infiammatorie come IL-17 e simultaneamente inibisce la generazione e l'azione dei T-Reg .

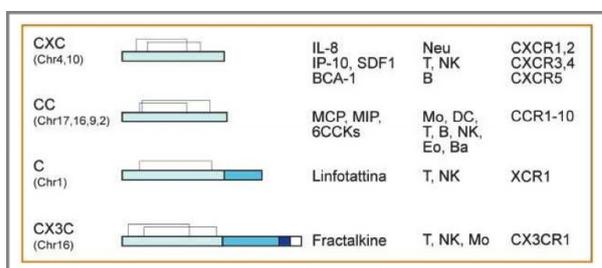


Effetti pleiotropici e ridondanti di TNF- , IL-1 e IL-6			
Effetti	TNF-	IL-1	IL-6
Pirogeno endogeno	+	+	+
Sintesi delle proteine di fase acuta	+	+	+
Aumento della permeabilità vascolare	+	+	+
Aumento espressione delle CAM	+	+	-
Induzione di chemochine	+	+	-
Induzione di IL-6	+	+	-
Cachessia	+	+	-
Inibizione a livello del midollo osseo	+	-	-

Queste erano le tre citochine della triade infiammatoria che come si vede possiedono delle azioni in comune , caratteristica delle citochine , la ridondanza ; inoltre con il pleiotropismo agiscono su cellule di tipo diverso .

- Chemochine

Le chemochine sono una famiglia di circa 50 citochine strutturalmente simili , formate da polipeptidi di 8-12 kD contenenti ponti disolfuro intracatena . Chiamate così dalla fusione di chemotassi e



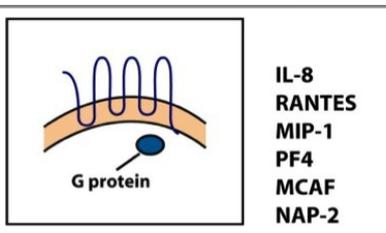
citochine . Sulla base della posizione e numero dei residui di cisteina (N-Terminali e responsabili dei ponti S:S) vengono classificate in 4 gruppi ulteriori :

- CC in cui i primi due residui di cisteina sono adiacenti
- CXC in cui i residui sono separati da un aminoacido qualsiasi
- C se è presente solo un residuo di cisteina
- CX3C se sono presenti due residui separati da tre aminoacidi qualsiasi .

Hanno la funzione di richiamare i leucociti nel sito di infezione e sono anche attive nei normali processi di traffico leucocitario .

Vengono prodotte da diversi tipi cellulari come le cellule endoteliali , le cellule epiteliali e i fibroblasti e nella maggior parte dei casi la loro produzione è indotta da microrganismi che attivano i TLR e da citochine infiammatorie quali TNF e IL-1 , rappresentando quindi un legame importante tra immunità specifica e reclutamento leucocitario .

Per quanto riguarda il reclutamento , le chemochine legano eparansolfati dei proteoglicani espressi dalle cellule endoteliali e vengono in questo modo presentate ai leucociti circolanti (che hanno interagito con l'endotelio attraverso le selectine); questa presentazione ai leucociti è fondamentale perché induce l'attivazione delle integrine dei leucociti , rendendo più forti adesione e migrazione extravasale .



I recettori sono quei recettori a sette domini ad alfa-elica transmembrana accoppiati a proteine G . Questi inducono la sostituzione GTP/GDP che attiva la G il quale regola enzimi intracellulari per l'organizzazione del citoscheletro e l'affinità delle integrine . Inoltre l'espressione dei recettori

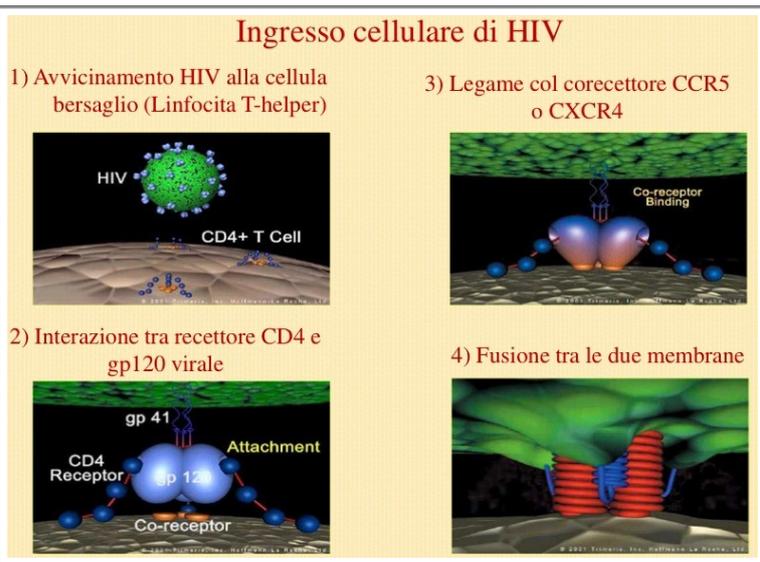
per le chemochine viene rapidamente ridotta a seguito di questa interazione , che fa terminare molto velocemente la risposta .

I linfociti T presentano il più ampio spettro di espressione dei recettori per le chemochine .

I recettori CCR5 e CXCR4 agiscono da corecettori per il virus dell'HIV ; vediamo infatti un primo avvicinamento dell'HIV alla cellula bersaglio , il linfocita T-Helper , cui segue un'interazione tra recettore CD4 e gp120 virale ; quindi avviene il legame col corecettore CCR5 o CXCR4 e le due membrane si

fondono (nell'HIV è trattato ampiamente e Testi spesso la chiede)

Della famiglia CXCL fanno parte l'IL-8 , ENA-78 (peptide di derivazione epiteliale , attivante i neutrofilo) , PF-4 (fattore piastrinico 4) e GRO-alfa(fattore stimolante la crescita del melanoma) ; generalmente i membri di questa famiglia vengono prodotti dai fagociti mononucleati , dalle cellule endoteliali e dai fibroblasti , attivati da TNF-alfa e IL-1 e sono citochine attivatrici e chemotattiche per i neutrofilo (sono i mediatori dell'infiammazione acuta) ; inoltre ricordiamo la presenza all'interno di questa famiglia del recettore CXCR4 per l'HIV .



Della famiglia CCL vediamo Rantes , MCP-1, -2 e -3 (fattori chemotattici e attivanti i macrofagi) , MIP-1 e -2 (proteine infiammatorie per i macrofagi) e la Eotassina (CCL11 fattore chemotattico per gli eosinofili) ; i membri di questa famiglia vengono prodotti da linfociti T attivati e sono chemotattici per i monociti e gli stessi linfociti T ; ricordiamo il recettore CCR5 per l'HIV .

Della famiglia con un solo residuo di cisteina , C , ricordiamo la Linfoactina , prodotta dai linfociti e fattore chemotattico per gli stessi linfociti .

Della famiglia CX3C invece ricordiamo la Fractalina , prodotta dalle cellule endoteliali attivate e fattore chemotattico per NK , monociti e T CD8+ .

- Attività Biologiche :

Come detto sono prodotte dai leucociti in risposta a stimoli esogeni , mentre le chemochine che regolano il traffico cellulare attraverso i tessuti sono prodotte costitutivamente da diversi tipi cellulari presenti negli stessi tessuti .

Le chemochine reclutano le cellule deputate alla difesa dell'ospite nel focolaio d'infezione ; le chemochine stimolano la migrazione dei leucociti attraverso un gradiente di concentrazione della citochina chemotattica .

Le chemochine regolano la migrazione di linfociti e leucociti attraverso tessuti linfoidei periferici , infatti vengono concentrate in zone determinate in modo da richiamare le cellule dotate degli appositi recettori .

Importante è la funzione di promozione dell'**angiogenesi** e il riparo delle ferite . CXC può agire da fattore pro-angiogenetico (nelle fasi precoci del processo di riparo della ferita) e anche da fattore inibitore dell'angiogenesi (nelle fasi terminali) .

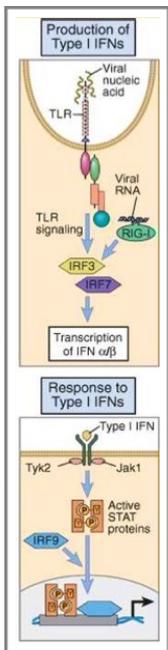
Le chemochine sono coinvolte anche nello sviluppo di diversi organi non linfoidei , infatti topi ko per CXCR4 presentano alterazioni nello sviluppo del cuore e del cervelletto , condizioni incompatibili con la vita , quindi sono collegate nei processi di morfogenesi .

- Interferoni , **IFN**

Cellule infettate da un virus non possono essere reinfezionate né dallo stesso virus né da un ceppo diverso , il fattore che determina resistenza alla super-infezione è l'IFN . Gli interferoni sono dei fattori proteici solubili , che mediano la risposta immunitaria innata contro le infezioni di tipo VIRALE . Il nome infatti deriva dalla capacità che hanno queste citochine nell'interferire con l'infezione virale .

CARATTERISTICA	INTERFERONI		
	ALFA	BETA	GAMMA
Precedente denominazione	IFN-leucocitario	IFN-fibroblastico	IFN-immunitario
Geni	Tipo I > 20	Tipo I 1	Tipo II 1
Peso molecolare "dalton"			
Sottotipi principali	16.000-23.000	23.000	20.000-25.000
Clonati	19.000	19.000	16.000
Glicosilazione	No [†]	Si	Si
Stabilità a pH 2	Stabile [†]	Stabile	Labile
Induzione	Virus	Virus	Attivazione immunitaria
Principale fonte	Epitelio, leucociti	Fibroblasti	Linfociti
Presenza di introni nel gene	No	No	Si
Grado di omologia con IFN-alfa	100%	30-50%	< 10%

Sono suddivisi in due gruppi principali : Interferoni del **tipo I** di cui fanno parte l'IFN-alfa e l'IFN-beta (poi anche epsilon , kappa e omega) e sono codificati da geni appartenenti ad un unico locus sul cromosoma 9 ; poi ci sono gli interferoni di **tipo due** di cui fa parte l'IFN-gamma . Questi possono essere distinti per capacità antivirale , sensibilità a pH acido , calore e peso molecolare . Gli IFN alfa e beta sono prodotti da quasi tutti i tipi cellulari infetti , mentre gli IFN gamma solamente da linfociti Th1 attivati e da NK .



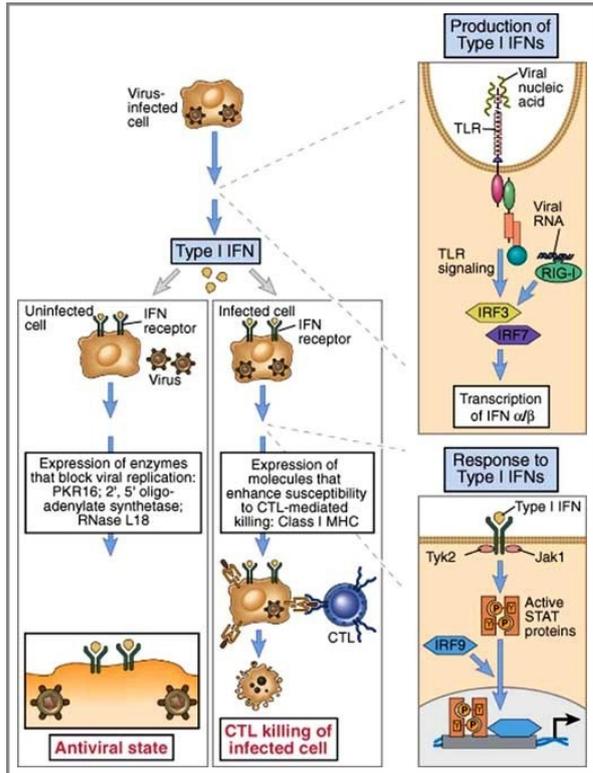
I produttori principali dell' IFN alfa sono i fagociti mononucleati e le cellule dendritiche plasmocitoidi ; queste cellule dendritiche circolano nel sangue e sono presenti in diversi tessuti e sono fondamentali soprattutto nelle fasi precoci della risposta innata . L'IFN beta è formata da una singola proteina prodotta da molti tipi cellulari come fibroblasti e per tale ragione è anche chiamato interferone fibroblastico

Il più potente stimolo per la produzione di IFN I è sicuramente l'**acido nucleico virale** . Questi si legano a diversi recettori intracellulari , o sensori , associati a vie di trasduzione del segnale che attivano la famiglia dei fattori di trascrizione **IRF** (Fattore Regolatore Interferone) . Infatti ci sono TLR con caratteristica disposizione intracellulare , come TLR 3 , 7 e 9 associati alle membrane endosomiali ed anche RIG-1 , che riconoscono RNA a doppia elica (dsRNA) e a singola elica e sequenze di DNA ipometilate attivando così IRF 3 e 7 ed attivando l'espressione degli interferoni I

Inoltre i linfociti T attivati dall'antigene stimolano i fagociti mononucleati a sintetizzare IFN I con CD40-CD40L .

Tutti gli IFN di tipo I legano lo stesso recettore espresso sulla superficie delle cellule bersaglio e inducono effetti simili . Il recettore è membro della famiglia dei recettori per le citochine di tipo II , un eterodimero costituito da due proteine strutturalmente correlate , IFNAR1 e IFNAR2 , associate a Tyk2 e Jak1 . Dopo questa interazione , queste due chinasi si attivano e causano la fosforilazione di STAT1 e STAT2 e contemporaneamente reclutano IRF9 , il regolatore del fattore di trascrizione dell'interferone . Il risultante complesso STAT1/2+IRF9 entra nel nucleo , dove va a legare sequenze di DNA specifiche chiamate **ISRE** (IFN-Stimulated Response Elements) , causandone la trascrizione .

- Attività Biologiche :



Gli IFN inibiscono la replicazione virale , perché stimolano le cellule a sintetizzare enzimi che inibiscono la trascrizione dell'RNA virale o DNA virale . Questo gruppo di enzimi comprende la serina-treonina chinasi PKR16 , la 2',5' oligoadenilato sintetasi e le RNasi L18,19 .

Può agire con un meccanismo paracrino , infatti la cellula infetta secerne IFN che va a proteggere le cellule adiacenti , che potranno essere o già state infettate ed allora porterà ad un tipo di riposta , oppure andrà a stimolare con IFN cellule sane , ed allora otterrà tutt'altro tipo di risposta . Agisce anche in modo autocrino , in quanto va ad inibire la replicazione virale all'interno di essa stessa .

Su quelle cellule infettate andrà a promuovere l'espressione di MHC I , le quali presenteranno l'antigene virale ai CD8+ promuovendo di fatti la loro eliminazione ;

contemporaneamente potenziano l'attività delle NK .

Sulle cellule che invece ancora non sono state infettate andrà a proteggerle , infatti l'IFN andrà a promuovere l'espressione di enzimi che bloccano la trascrizione virale (quelli di prima) .

Inibisce la proliferazione dei linfociti , può promuovere il sequestro di questi all'interno degli organi linfoidi favorendo il riconoscimento dell'antigene che si concentrerà in questa sede .

Stimola lo sviluppo di linfociti Th1 inducendo l'espressione di IL-12 .

Inoltre può essere utilizzato in campo terapeutico , infatti l'IFN-alfa viene usato come agente antivirale per l'epatite B e C , per alcuni tumori ematici , il melanoma , il Sarcoma di Kaposi ; l'IFN-beta viene utilizzato nel trattamento della Sclerosi Multipla .

- IL-10

Agisce come principale inibitore dei macrofagi attivati e delle cellule dendritiche ed è quindi implicata nel controllo delle risposte innate e dell'immunità cellulo-mediata .

Il-10 è un membro delle citochine dimeriche legate non covalentemente ; ogni sua catena ha sei alfa eliche che si intercalano con le altre provenienti dall'altra catena (come IL-19,-20,-22,-24,-26).

Riconosce i recettori del tipo II (slides dice I) , che si associano a Tyk2 e Jak1 , mentre il secondo messaggero è STAT3 .

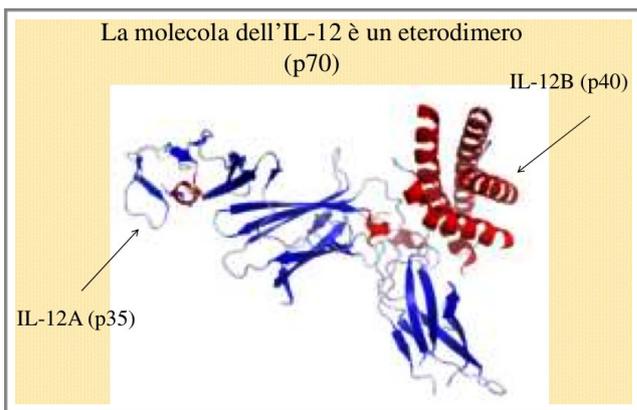
Viene prodotta principalmente da macrofagi attivati e dalle T Regolatorie , ma può essere prodotta anche da altri tipi cellulari , come i cheratinociti .

- Attività Biologiche :

Inibisce la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi attivati e delle cellule dendritiche , visto che questa citochina è necessaria per la produzione di IFN-gamma e per potenziare le risposte innate ; infatti originariamente veniva descritto come inibitore dell'IFN-gamma .

IL-10 inibisce inoltre l'espressione delle molecole costimolatorie e delle MHC II sempre da parte di queste due APC .

Inibisce la produzione di prostaglandine E2 ; inibisce la produzione dell'anione superossido e dei metaboliti reattivi dell'ossigeno ROI ; inibisce la produzione di altre interleuchine oltre alla 12 , quali , IL-1 , -6 e -8 , oltre a TNF e ad inibire la trascrizione del gene per IL-2 .

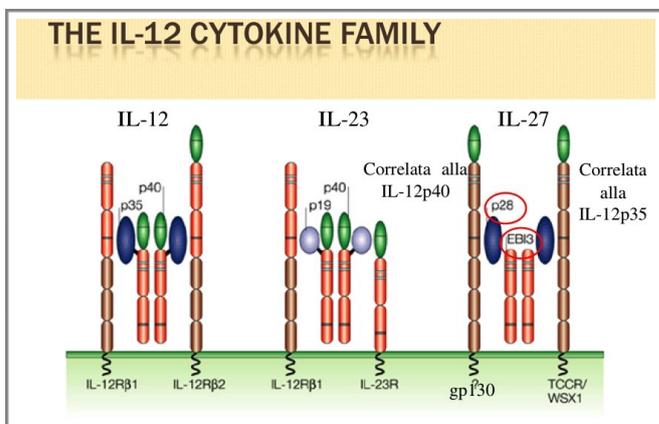


- IL-12

E' il principale mediatore delle fasi precoci della risposta immunitaria innata a microrganismi intracellulari .
 Principalmente stimola la produzione di IFN-gamma dalle NK e favorisce il differenziamento dei CD4+ in Th1 che producono IFN-gamma .

- Struttura :

E' un eterodimero composto da due subunità di 35 kD e 40 kD (chiamate p35 e p40) unite da ponti disolfuro , per un totale di 70 kD di peso ; la p35 è formata da 4 domini globulari ad alfa-elica , mentre p40 presenta omologia col domino extracellulare per IL-6 .



IL-12 appartiene ad una famiglia composta da almeno 5 citochine le cui subunità presentano almeno una delle due catene (35 o 40) , come IL-23 e IL-27 , che collaborano con IL-12 nell'induzione delle risposte immunitarie mediate da linfociti T .

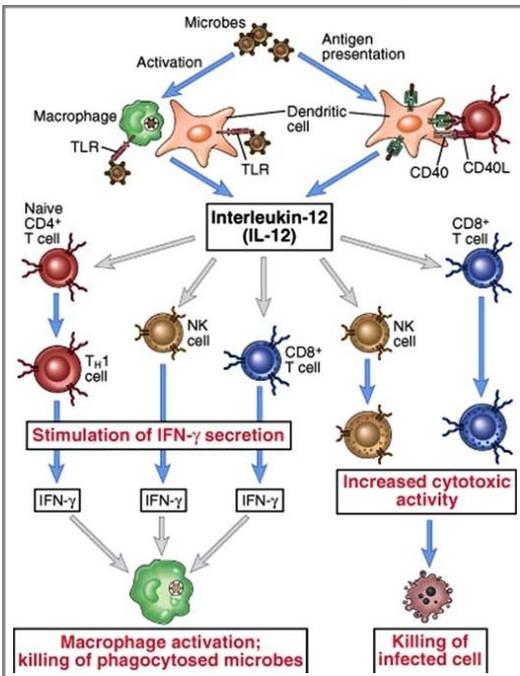
- Produzione :

La principale sorgente sono i fagociti mononucleati e le cellule dendritiche attivate (specifiche per 40 a differenza della 35 che può essere prodotta da altri tipi cellulari) .

- Recettore :

Il recettore per l'IL-12 (IL-12R) appartiene ai recettori delle citochine di tipo I . E' un eterodimero composto da due subunità , Beta1 e Beta2 , entrambe omologhe a p130 dei recettori per IL-6 .

La subunità p40 di IL-12 lega la subunità Beta1 , mentre la subunità p35 lega la subunità Beta2 ; entrambe le subunità quindi sono importanti nel legare ad alta affinità questa citochina ; il legame porta all'attivazione della via di trasduzione Jak-STAT (chinasi Janus - Segnale Trasduttore e Attivatore della Trascrizione) .



- Attività Biologiche :

Induce la produzione di IFN-gamma da parte di NK e linfociti T attivati (che a sua volta stimola i macrofagi attivandone i meccanismi battericidi) .

Assieme a IFN-gamma induce la differenziazione dei linfociti T CD4+ in TH1 che producono IFN-gamma .

Potenzia l'attività citotossica delle NK e dei linfociti T CD8+ .

Una mutazione della subunità Beta1 del recettore induce una suscettibilità nei confronti delle infezioni intracellulari , come micobatteri e Salmonella .

- IL-23

Assieme ad IL-27 ha una struttura simile ad IL-12 ed IL-6 .

E' una citochina eterodimerica composta da una catena di 19 kD specifica (p19) che si associa a p40 della IL-12 .

Viene prodotta principalmente dai macrofagi e dalle cellule dendritiche in risposta a infezioni microbiche .

Il recettore è espresso sui NK e su T ; è un eterodimero composto da una catena specifica IL-23R associata alla catena Beta1 del recettore per IL-12 .

Viene prodotta durante delle manifestazioni infiammatorie abnormi che si osservano per esempio nelle patologie autoimmuni .

- Attività Biologica :

Induce la sintesi della citochina pro-infiammatoria IL-17 da parte dei CD4+ Th17 (li stimola a differenziarsi anche in Th17 e a mantenerli) .

- IL-27

E' un eterodimero composto da una subunità ad alfa-elica o subunità p28 (correlata a p40) e dalla subunità EB13 (correlata a p35) .

Il suo recettore condivide la subunità gp130 del recettore per IL-6 e viene espresso principalmente da NK e NK quiescenti , T effettori , di memoria e regolatori .

Insieme ad IL-12 stimola la differenziazione degli

TH1 e la loro produzione di IFN-gamma .

Ha un'azione opposta a quella dell'IL-23 , in quanto inibisce la differenziazione TH17 e la loro produzione di IL-17 .

Quindi viene definita pro-infiammatoria e anti-infiammatoria .

- IL-17

E' prodotta dalle Th17 . E' una citochina pro-infiammatoria ; aumenta la produzione delle chemochine come IL-8 , MCP-1 e quindi promuove il reclutamento dei neutrofili e dei monociti .

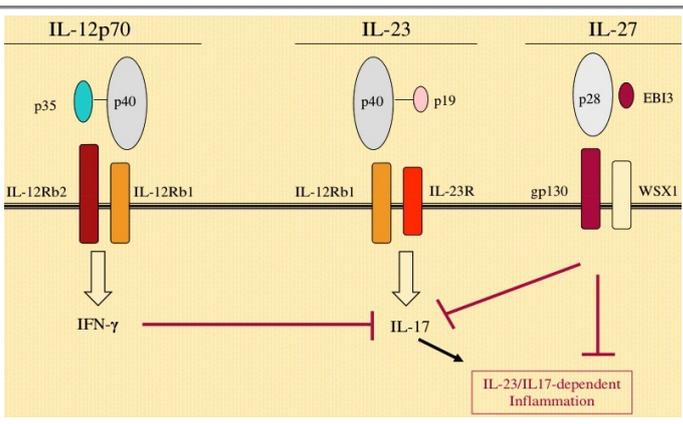
Stimola , inoltre , la produzione di IL-6 , di PGE2 e l'induzione della molecola ICAM , incrementando la risposta infiammatoria .

Stimola la produzione delle citochine ematopoietiche , come G-CSF e GM-CSF . Una produzione elevata dell'IL-17 è associata all'artrite reumatoide , la sclerosi multipla , LES e l'asma .

- IL-15

L'attività di questa citochina è simile a quella dell'IL-2 .

E' sintetizzata precocemente nel corso delle infezioni virali e in risposta all'LPS dai fagociti mononucleati .



Stimola la crescita dei linfociti T , soprattutto CD8+ e cellule memoria , NK e delle NK-T .

E' chemiotattica per i linfociti T ed induce e potenzia il killing delle cellule LAK .

Il suo recettore è costituito da una catena alfa che lega la citochina e da IL-2/15RBeta e Gamma comune che trasducono il segnale attivando Jak/STAT .

- IL-18

Definito "fattore inducente l'IFN-gamma" , ha un'attività biologica simile all'IL-1 .

E' una citochina pro-infiammatoria , prodotta nell'infiammazione acuta in risposta all'LPS ed altri prodotti batterici e stimola la produzione di IFN-gamma nelle NK e Th , e in tal senso ha un'azione sinergica con l'IL-12 .

E' prodotta dai macrofagi e dalle cellule dendritiche , stimola la differenziazione dei linfociti Th1 affinché producano IFN-gamma .

Si lega al recettore per l'IL-1 .

2) Citochine che regolano l'immunità specifica

- Interleuchina-2 ⇒ Proliferazione, Sopravvivenza
- Interleuchina-4 ⇒ Switch IgE
- Interleuchina-5 ⇒ Eosinofili
- Interleuchina-13 ⇒ Switch IgE
- Interleuchina-17 ⇒ CD4⁺ T_H17
- Interferone-γ ⇒ Macrofagi, MHC I e II
- Fattore di crescita trasformante-β ⇒ Immunosoppressione

Nella fase di attivazione della risposta specifica , le citochine hanno il compito di stimolare la proliferazione e la differenziazione dei linfociti attivati dall'antigene . Le principali citochine di questa sono quelle presenti nell'immagine .

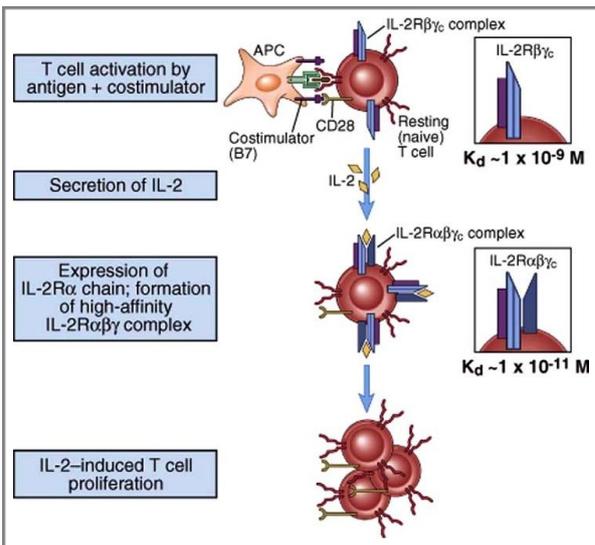
- IL-2

È un fattore di crescita , sopravvivenza , stimolazione per i linfociti T .

Viene prodotta dai linfociti T CD4+ in seguito al riconoscimento dell'antigene . La sua produzione è transitoria ed il picco di secrezione arriva a 8-12 ore dal riconoscimento .

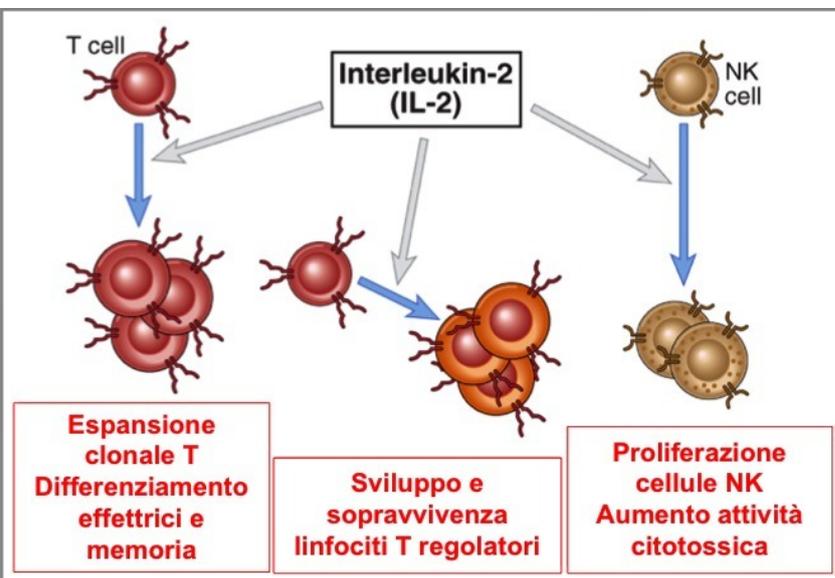
Nella sua forma secreta IL-2 è una glicoproteina di 14-17 kD caratterizzata dalla presenza di 4 domini ad alfa-elica , quindi riconosce i recettori per le citochine del primo tipo .

L'espressione dei recettori è diversa tra CD4+ e T-Regolatori , anche se la struttura di questi recettori è la stessa . Il recettore è un eterotrimerico IL-R formato da una subunità **alfa** , che è specifica dell'IL-2 e viene chiamata CD25+ , la quale va a legarsi con bassa affinità all'IL-2 e sarà l'associazione con le altre catene ad aumentare l'affinità del legame ; una subunità **Beta** chiamata IL-2/15RBeta che contribuisce a formare il recettore anche dell'IL-15 e causa l'attivazione della via di trasduzione Jak/STAT ; la terza subunità viene chiamata "**Gamma comune**" , perché è condivisa da altri recettori per IL come la 4, 7 e 15 .



Il complesso eterotrimerico sulle cellule non esiste già formato , perché manca la catena alfa associata , infatti vediamo un complesso IL-2RBeta-Gamma comune ; la stimolazione dell'antigene però andrà ad indurre l'espressione *de novo* di IL-2Ralfa e viene aumentata contemporaneamente l'espressione della catena Beta ; per questa ragione la catena alfa veniva chiamata antigene *Tac* o antigene di attivazione T ; a questo punto le cellule che esprimono con alta affinità il recettore IL-2R-alfa-beta-gamma comune legheranno con alta affinità l'IL-2 passando dal complesso dimerico a Kd 10*-9 al trimerico assemblato Kd 10*-11 .

Come detto prima l'espressione di questo recettore per CD4+ e T regolatori è differente ; infatti nei regolatori questo recettore viene espresso costitutivamente anche senza la stimolazione dell'interleuchina o dell'antigene ; nei linfociti T quiescenti e nelle NK viene espresso a bassi livelli fino alla stimolazione antigenica .



L'espressione cronica dei linfociti T porta ad un'espressione alta in forma solubile della catena alfa e l'aumento di questa , a livello clinico rappresenta un forte segnale di attivazione antigenica .

- **Attività Biologiche :**

IL-2 è necessario per la sopravvivenza e per la proliferazione dei **T regolatori** . Topi ko per IL-2 , o alfa o Beta sviluppano delle linfadenopatie e autoimmunità T-

dipendenti e mancano di T Reg ; di conseguenza IL-2 regola l'immunità agli antigeni self .

IL-2 stimola la sopravvivenza , la proliferazione e il differenziamento dei linfociti **T** attivati (e non solo T) dall'antigene infatti induce la proteina anti-apoptotica Bcl-2 , promuove la progressione del ciclo cellulare inducendo la sintesi delle cicline e toglie il blocco del ciclo stesso promuovendo p27 . Induce nei linfociti T la produzione di IFN-gamma e di IL-4 .

Nei linfociti **NK** stimola la proliferazione e il differenziamento e ne potenzia l'attività citotossica . Nelle NK principalmente il complesso Beta-Gamma comune viene associato alla catena alfa del recettore dell'IL-15 , quindi in queste cellule IL-15 agisce come principale fattore di crescita e non IL-2 (anche se partecipa ovviamente) .

Nei linfociti **B** , invece , induce proliferazione e la sintesi di anticorpi .

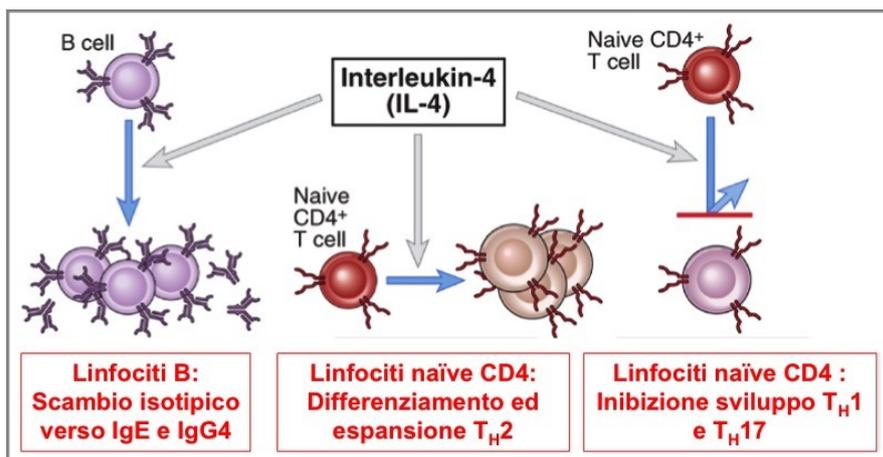
- IL-4

IL-4 è un membro della famiglia a 4 domini ad alfa-elica e pertanto riconosce i recettori del primo tipo .

La principale fonte dell'IL-4 sono i CD4+(Th2) , i mastociti e i basofili .

Il recettore è formato da una catena alfa (recettore del primo tipo) e poi da una catena gamma comune . Questo eterodimero trasduce il segnale attraverso Jak/STAT e l'attivazione di un secondo messaggero chiamato IRS-2 (Insulin Response Substrate 2) .

- Attività Biologiche :



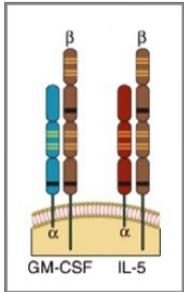
1) E' la principale citochina responsabile dello scambio isotipico verso la classe IgE nei linfociti B . Nei topi ko si osserva una drastica riduzione dei livelli basali di IgE (meno del 10%) ; quindi è importante nella risposta contro elminti e artropodi (essendo IgE impegnata contro questi) . Le IgE rappresentano il principale mediatore dell'ipersensibilità immediata (allergie) . Inoltre induce lo scambio isotipico verso

le IgG4 (IgG1 nel topo) e inibisce lo scambio verso IgG2 e IgG3 (stimolati da IFN-gamma) .

2) Induce lo sviluppo degli Th2 attraverso un meccanismo di stimolazione autocrino . Inibisce lo sviluppo dei linfociti Th1 e Th17 .

3) Inibizione dall'attivazione biologica di IFN-gamma .

- IL-5



E' un membro della famiglia a 4 domini ad alfa-elica .

La principale fonte sono i linfociti T CD4+ Th2 , ma anche da mastociti attivati .

Il recettore è composto da una subunità alfa specifica e da una catena Beta comune (in comune con IL-3 e GM-CSF) . La catena alfa che è specifica dell'IL-5 va a legare con bassa affinità e quindi non è in grado di legare IL-5 ,quindi necessita della catena beta per attivare la via Jak/STAT .

- Attività Biologica :

La funzione principale è quella della stimolazione della proliferazione e della differenziazione degli eosinofili , i quali esprimono sulla propria superficie i recettori per le IgE e quindi sono in grado di riconoscere i microrganismi come gli elminti . Topi ko per l'IL-5 mostrano un deficit nelle risposte mediate da eosinofili e sono più suscettibili alle infezioni da elminti .

-IL-13

Fa parte della famiglia a 4 domini ad alfa-elica , con una significativa omologia con IL-4 ; è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 5 , in una regione che codifica pure per IL-4 e IL-9 .

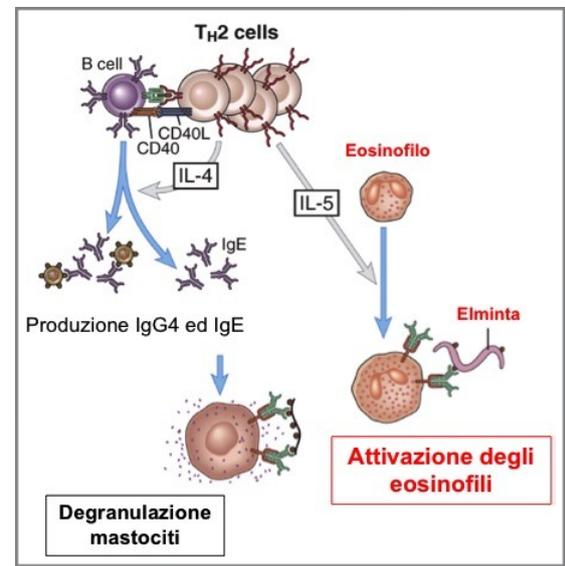
Viene prodotta principalmente dai linfociti Th2 , ma anche da CD8+ e da NK-T (in minima parte anche basofili ed eosinofili) .

Il recettore è composto da un eterodimero con la catena alfa dell'IL-4 e dalla catena IL-13Ralfa1 . Questo complesso lega ad alta affinità sia IL-13 che IL-4 , quindi molti effetti biologici esercitati da IL-4 possono essere esercitati anche da IL-13 (ridondanza) . Viene espresso dai fibroblasti , macrofagi , cellule epiteliali e linfociti B .

- Attività Biologiche :

Ha come detto delle funzioni in comune con IL-4 nello scambio isotipico verso le IgE e nel mediare l'azione degli eosinofili , quindi nella difesa contro i parassiti come gli elminti .

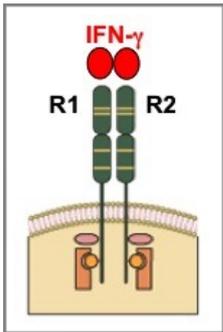
Poi ha delle funzioni diverse , come l'induzione della produzione di collagene da parte dei fibroblasti e macrofagi o fibrosi (che contribuisce significativamente alla patogenesi dell'asma cronico) .



Stimola poi la secrezione di muco dalle cellule mucipare dei bronchi (è coinvolta nella patogenesi della malattia polmonare interstiziale diffusa) .

Induce l'espressione delle molecole di adesione e chemochine nell'infiammazione , per il reclutamento quindi .

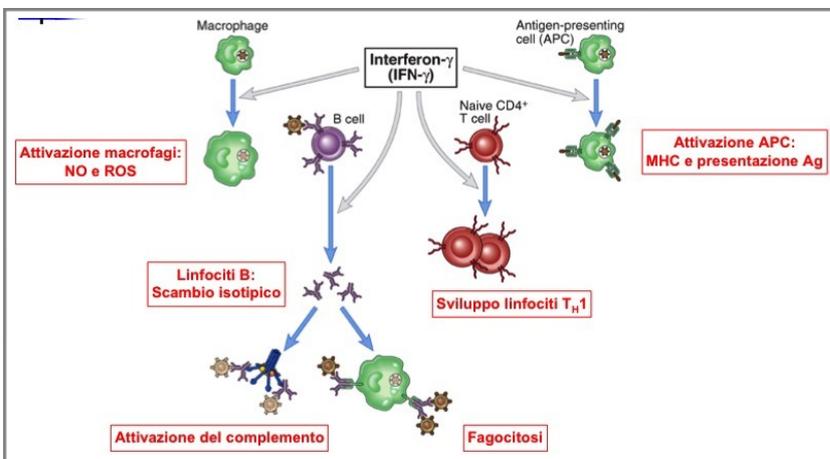
-Interferone Gamma , **IFN Gamma**



E' la principale citochina per l'attivazione dei macrofagi e viene definito IFN immunitario di tipo II .

Viene prodotta da NK , linfociti T CD8+ e da linfociti T CD+ Th1 , di cui ne rappresenta la funzione prototipica .

Il recettore per IFN-gamma è composto da due catene polipeptidiche strutturalmente omologhe (recettore di tipoII) e definite IFN-gammaR1 e IFN-gammaR2 , che si associano a Jak1 e Jak2 . Una volta attivati STAT1 viene fosforilato e dimerizzato e va a legarsi alle sequenze GAS . I geni per IFN-gamma codificano per molte proteine coinvolte nell'amplificazione delle risposte immunitarie e nelle funzioni effettrici dei macrofagi .



- Attività Biologiche :

- Attiva i macrofagi ad uccidere i microbi fagocitati ; è il principale meccanismo (insieme a CD40) con cui i linfociti Th1 potenziano le funzioni dei macrofagi . Questo interferone è il solo modo con cui le NK possono attivare i macrofagi nelle risposte innate . Stimola le azioni microbicide dei macrofagi inducendo la

sintesi di ossido nitrico e intermedi reattivi dell'ossigeno .

- Promuove la differenziazione dei CD4+ in Th1 ed inibisce Th2 (antagonizzando IL-4) . Stimola la sintesi di T-bet , un fattore trascrizionale che induce il differenziamento dei CD4+ in Th1 ; inibisce invece il differenziamento in Th2 attraverso T-bet che sopprime GATA-3 principale fattore di trascrizione in questo differenziamento .

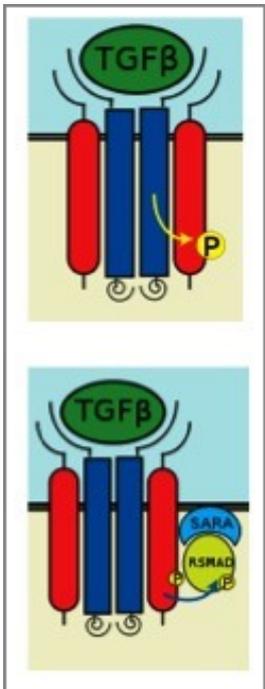
- Agisce sui linfociti B promuovendo lo scambio isotipico verso le sottoclassi di IgG antagonizzando IL-4 ancora e sempre antagonizzando inibisce lo scambio verso IgE e IgG1(nel topo) .

- Stimola l'espressione sulle APC delle molecole MHC I e II e di molecole costimolatorie . In questo modo andrà ad aumentare il meccanismo di presentazione dell'antigene . Infatti stimola la produzione di TAP , delle componenti LMP-2 e LMP-7 per il proteasoma e delle molecole HLA-DM .

- Può essere usato in campo terapeutico nella malattia granulomatosa cronica (capitolo 20) , nel carcinoma di cellule renali e nella leucemia mieloide cronica .

- Fattore di crescita trasformante-Beta , **TGF-B**

La sua funzione principale è quella di inibire la proliferazione e l'attivazione di linfociti e leucociti . Sono una famiglia di citochine correlate tra loro , ma codificate da geni distinti e sono : TGF-beta1 , TGF-beta2 e TGF-beta3 , ma le cellule dei SI sintetizzano principalmente la 1 .



E' una proteina omodimerica sintetizzata e secreta dai linfociti T stimolati dall'antigene e anche da macrofagi stimolati dall'antigene . Alcuni T Reg possono produrre contemporaneamente al TGF-B anche IL-10 con attività immunosoppressiva . Viene sintetizzato come precursore e viene scisso proteoliticamente nel Golgi per formare l'omodimero ; la forma matura è secreta in associazione ad altri polipeptidi che devono essere rimossi enzimaticamente nell'ambiente extracellulare ; se ciò non avviene TGF-B non può legare il proprio recettore .

Il recettore è costituito da due diverse proteine , due catene polipeptidiche ciascuno , ALK5 (Activation receptor-Like Kinase 5) e TGFBR2 che trasducono il segnale grazie ad un dominio dotato di attività serina-treonina chinasi che induce fosforilazione di fattori di trascrizione chiamati Smad .

- Attività Biologiche :

- Inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei linfociti T e l'attivazione dei macrofagi , quindi ha un'azione immunosoppressiva , attenua o termina le risposte immunitarie ed infiammatorie .

- Regola la differenziazione dei linfociti T , infatti blocca lo sviluppo di Th1 e Th2 , ma al contrario può (o potrebbe?) promuovere la differenziazione in Th17 .

- Sui linfociti B promuove lo scambio isotipico verso IgA .

- Regola il processo di riparo dei tessuti , dopo attenuazione dei processi infiammatori ; stimola infatti i macrofagi e i fibroblasti a sintetizzare collagene e stimola gli enzimi deputati al rimodellamento della matrice extracellulare .

- Stimola il processo angiogenico .
- Altre citochine
- LT , linfotossina

Ha un'omologia di struttura del 30% con il TNF-alfa ed hanno funzioni simili . La forma di membrana riconosce un altro recettore rispetto al TNF , mentre la forma secreta lo stesso recettore . Regola l'infiammazione acuta attivando le cellule endoteliali ed i neutrofilo . Topi ko per il gene per TNF-beta , ha dei deficit nello sviluppo delle aree B degli organi secondari , come nei linfonodi , nelle placche di Peyer e nella polpa bianca della milza .

- BAFF e APRIL

Sono correlate alla famiglia del TNF e sono importanti nella sopravvivenza dei linfociti B . Vari tipi di cellule producono BAFF , mentre APRIL viene prodotto principalmente da monociti , T attivati e cellule dendritiche . La loro espressione viene indotta da molte citochine pro-infiammatorie . Si legano a recettori per TNF , come TACI e BCMA , e BAFF solamente riconosce il BAFF-R ; tutti questi portano all'attivazione di NF-kB e alla produzione di Bcl-2 . BAFF-R stimola la sopravvivenza dei B , TACI è necessario nello scambio isotipico da IgA a IgG e BCMA è necessario per la sopravvivenza delle plasmacellule nel midollo osseo .

3) Citochine che stimolano l'Emopoiesi

Sono necessarie per i normali processi emopoietici ; regolano le risposte delle cellule del midollo ; stimolano la crescita e il differenziamento dei progenitori presenti nel midollo osseo e in questo modo riescono a sopperire l'eliminazione dei leucociti in periferia , producendone di nuovi .

La differenziazione ed espansione delle cellule progenitrici è dovuta a un gruppo di citochine chiamate **CSF** .

- IL-7 : è in grado di stimolare la sopravvivenza e la proliferazione dei precursori immaturi destinati a B e T . Il recettore è formato da una catena alfa specifica e dalla gamma comune . Pazienti con una mutazione della gamma comune , portano difetti nello sviluppo dei linfociti ; la malattia umana è definita immunodeficienza combinata grave al cromosoma X . E' essenziale per la sopravvivenza dei T maturi , naive e di memoria , i quali esprimono alti livelli per il recettore IL-7R .
- IL-3 : viene prodotta da CD4+ e favorisce la proliferazione di tutti i tipi cellulari emopoietici . Topi ko per questa citochina non mostrano importanti alterazioni del processo emopoietico .

Capitolo 13

Meccanismi effettori dell'immunità cellulo-mediata

L'immunità acquisita viene suddivisa principalmente in umorale e in cellulo-mediata . La cellulo-mediata è la funzione effettrice dei linfociti T . La fase effettrice dell'umorale comincia con il riconoscimento dell'antigene da parte degli anticorpi secreti e poi neutralizza microrganismi e tossine extracellulari . La cellulo-mediata viene attivata dal riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T sulle APC .

Tipi di reazioni immunitarie cellulo-mediate

- CD4+ Th1

Nella cellulo-mediata i T helper1 hanno la funzione di riconoscere l'antigene ed eliminare i microrganismi ingeriti , contenuti all'interno dei fagosomi dei fagociti . Per farlo andranno a potenziare le attività microbicide di questi fagociti . Alcuni però sopravvivono pure all'interno dei fagociti , riuscendo ad uscire dal fagosoma ed entrare nel citoplasma come i virus , dove si replicano , quindi serviranno i CD8+.

- CD8+

A differenza dei CD4+ questi andranno ad eliminare direttamente la cellula che ha fagocitato il microrganismo o che è infettata . Ciò assicura di eradicare totalmente l'infezione . Utilizzerà dei meccanismi completamente differenti dai CD4+ .

- CD4+ Th2

Questo tipo di helper invece sarà fondamentale per le risposte immunitarie verso gli elminti , che stimolano la produzione di IgE e attivano eosinofili e mastociti .

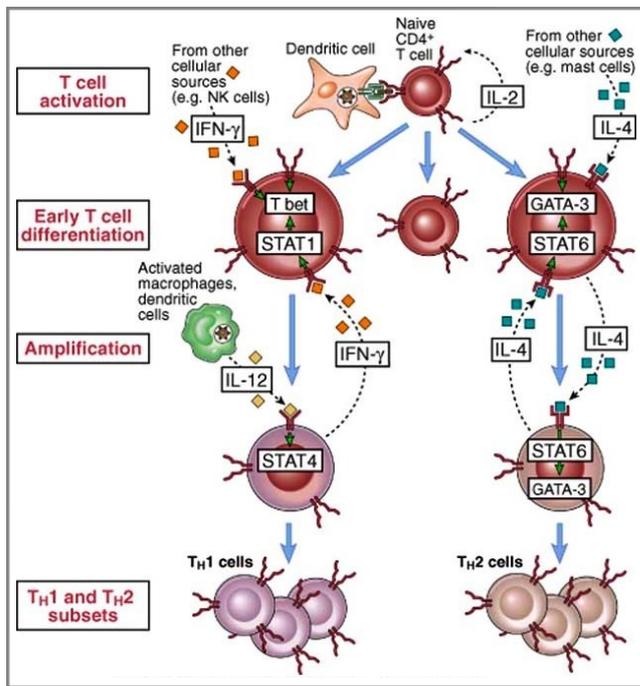
- L'attivazione dei macrofagi e dei T potrebbe portare a dei danni tissutali nell'ipersensibilità di tipo ritardato o DTH e possono essere la causa di alcune manifestazioni patologiche di alcune infezioni .

Linfociti T CD4+

Esistono distinte sottopopolazioni dei CD4+ che saranno caratteristiche per i microrganismi che andranno a debellare . Sono Th1 , Th2 e Th17 . Inoltre possono differenziare in T Regolatori e ce ne sono di diverso tipo (naturali e poi acquisiti Tr1 e Th3)

-Th1 e Th2

Il differenziamento in una di queste sottopopolazioni è indotto dai fattori di crescita o da citochine specifiche e



queste citochine espresse escludono una via o l'altra , sono mutuamente esclusive .

La citochina responsabile del differenziamento Th1 è l'IFN-gamma principalmente , che quindi esclude il differenziamento in Th2 ; parimenti , la citochina più importante per prendere la via Th2 è l' IL-4 che quindi contrasta IFN-gamma . In conseguenza di ciò , la risposta sarà sempre polarizzata verso una o l'altra via .

I linfociti Th1 e Th2 derivano dallo stesso precursore CD4+ Th0 e poi saranno i segnali a indirizzare una determinata via .

La **differenziazione** degli Th1 è stimolata da batteri intracellulari , come *Leisteria* e i micobatteri , e da alcuni parassiti come *Leishmania* , in grado di infettare i macrofagi . Viene attivata l'immunità innata , con produzione di IL-12 e IL-18 , nonché IFN del primo tipo .

Alcuni microrganismi legano i TLR quindi inducono direttamente la produzione di IL-12 , mentre altri inducono indirettamente la secrezione di queste citochine , andando a stimolare le NK a produrre IFN-Gamma che promuoverà la produzione di IL-12 .

I linfociti T inoltre possono essere attivati dall'interazione CD40L-CD40 tra APC e T .

Il segnale dell'antigene per il complesso del **TCR** andrà a stimolare un fattore di trascrizione **T-bet** (fattore di trascrizione della famiglia T-box , principale regolatore della differenziazione verso gli Th1) il quale andrà a stimolare la produzione proprio di IFN-gamma . Contemporaneamente **IFN-gamma** per il quale i CD4+ hanno i recettori , andrà a stimolare un fattore di trascrizione STAT1 , che a sua volta stimola T-bet e quindi induce la produzione di IFN-gamma . Ma non è finita qui , perché un'altra via esiste per produrre IFN-gamma , infatti , i CD4+ hanno anche i recettori per **IL-12** , che è un induttore di IFN-gamma , perché va ad attivare STAT4 .Questo è un meccanismo

di amplificazione che guida la differenziazione degli Th1 . Quindi il differenziamento viene indotto dal TCR e dalla contemporanea stimolazione di IFN-gamma .

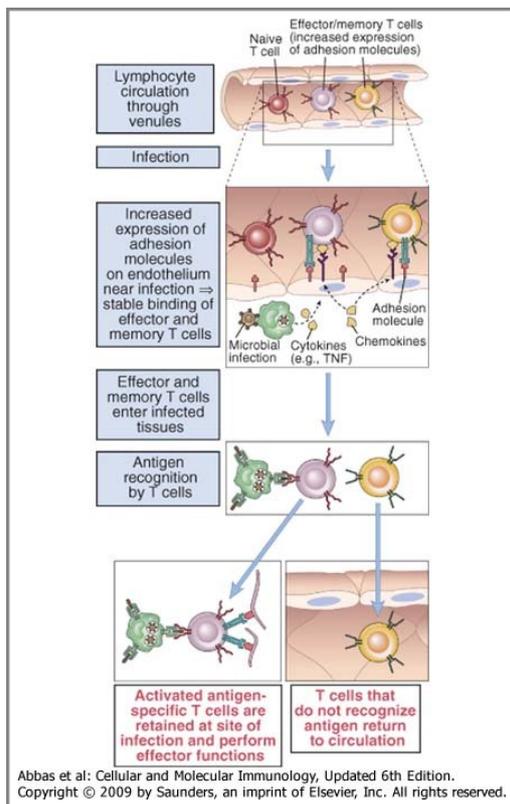
La differenziazione in Th2 è simile , e l'attore principale questa volta è IL-4 , che andrà a promuovere STAT6 , che a sua volta attiva GATA-3 (un fattore di trascrizione per IL-4,-5 e -13), responsabile della trascrizione dei geni per l' IL-4 . Quindi si ritorna ad IL-4 . Il-4 viene prodotta in piccole quantità quando il CD4+ viene stimolato , e man mano che la risposta va avanti , in quantità sempre maggiori , un'altra fonte potrebbero essere i mastociti .

Come già detto IL-4 andrà ad inibire l'azione di IFN-gamma e viceversa .

- Risposte mediate da Th1 - Migrazione Th1 e Attivazione macrofagi

La principale funzione degli Th1 è quella di debellare i microrganismi fagocitati andando a stimolare l'azione microbica dei macrofagi . IFN-gamma prodotto

stimola la produzione di IgG opsonizzanti che fissano il complemento e che quindi promuovono la fagocitosi . La prima fase è il riconoscimento dell'antigene sulle APC , cui segue l'attivazione , il differenziamento l'espansione e poi la fuoriuscita dagli organi linfoidi per andare alla ricerca dell'antigene nel focolaio di infezione . Questa migrazione coincide con l'aumento dell'espressione di alcune citochine da parte dell'endotelio , dei macrofagi e delle NK , come chemochine CXCL9,10,11 e CCL2,4,5 che andranno a legarsi ai recettori presenti sulla superficie dei linfociti T effettori . L'aumento è dovuto alla produzione di TNF e IL-1 da parte dei macrofagi , che richiamano nel sito di infiammazione le cellule del sistema immunitario . E' importante ora , che solo gli Th1 esprimano dei ligandi per le Selectine E e P ; infatti questo processo è mediato da T-bet , il che assicura che siano solamente Th1 ad aderire all'endotelio ; ancora solo gli Th1 esprimeranno i recettori per le chemochine CXCR3 e CCR5 . Dopo che sono penetrati nel sito



di infezione e che è stato effettuato il processo di diapedesi , vediamo che i linfociti Th1 attivati dall'antigene rimarranno all'interno del sito , mentre quelli non attivati riusciranno e ritorneranno in circolo . Questo accade perché il legame con l'antigene trattiene fisicamente questi Th1 , perché induce l'espressione di molecole integriniche come VLA-4 e VLA-5 , che legano la fibronectina presente nella matrice extracellulare e poi esprimono CD44 che lega l'acido ialuronico . Quindi il

processo di attraversamento del vaso è antigene indipendente , mentre il trattenimento nel focolaio di infezione è antigene dipendente .

I linfociti Th1 a questo punto andranno ad **attivare i macrofagi** affinché eliminino i microrganismi . Saranno i segnali provenienti dai linfociti T a promuovere la conversione dei monociti in macrofagi dotati della capacità microbicide .

I linfociti attivati dall'antigene producono IFN-gamma che andrà ad attivare i macrofagi e poi vengono indotti ad esprimere CD40L , per il quale i macrofagi hanno i recettori . I segnali ricevuti dell' IFN-gamma , più il ligando del CD40 , più i segnali dal TLR inducono i macrofagi ad acquisire proprietà microbicide , attraverso l'aumento di sintesi di molte proteine , come NF-kB e AP-1 (CD40) e STAT1 e IRF1(IFN-gamma) .

- I macrofagi attivati uccidono attraverso la produzione di intermedi dell'ossigeno ROS e ossido nitrico NO ; inoltre quelli attivati contengono una quantità maggiore di enzimi lisosomiali che uccidono i microrganismi fagocitati e che ora sono nei fagolisosomi .

- I macrofagi producono citochine come TNF , IL-1 e chemochine in grado di rafforzare il reclutamento di neutrofilo e monociti . Producono prostaglandine e leucotrieni e il fattore di attivazione piastrinico .

- I macrofagi attivati infine rimuovono le componenti tissutali danneggiate nell'infiammazione , facilitando la riparazione del tessuto , dopo che l'infiammazione si è attenuata ; infatti stimolano la proliferazione di fibroblasti , la sintesi di collagene , TGF-beta e l'angiogenesi (formazione di nuovi capillari) . " Pertanto il macrofago agisce come un chirurgo che cauterizza la ferita e restaura l'integrità al tessuto danneggiato dalla reazione infiammatoria " .

[DHT o Ipersensibilità Ritardata : il danno tissutale e l'infiammazione causati da Th1 e da macrofagi attivati sono i segni caratteristici di DHT , quelle reazioni che avvengono come danno collaterale durante una risposta .]

- Risposte mediate da Th2 :

La funzione principale è quella di promuovere la produzione di IgE e le reazioni mediate da eosinofili e mastociti contro infezioni elmintiche . Sono fondamentali anche nelle reazioni di ipersensibilità immediata .

Questi sono troppo grandi per essere fagocitati e più resistenti all'attività dei macrofagi . Th2 secerne IL-4 e IL-13 che stimolano la produzione di IgE specifiche per elminta , le quali opsonizzano il parassita e vengono riconosciuti dagli eosinofili ; inoltre Th2 secerne IL-5 che attiva direttamente gli eosinofili . Gli eosinofili attivati andranno a rilasciare il contenuto dei loro granuli come la proteina basica maggiore , la proteina cationica maggiore , in grado di intaccare gli elminti . I mastociti

esprimono i recettori funzionali per Fc delle IgE quindi vengono attivati e degranulano direttamente dalle IgE legate , rilasciando amine vasoattive , mediatori lipidici e TNF . Gli anticorpi prodotti in risposta a Th2 sono in grado di neutralizzare tossine e microrganismi . I macrofagi attivati da Th2 inoltre contribuiscono al rimodellamento del tessuto in corso di infezione cronica . Le risposte immunitarie di Th2 sono la causa principale di reazioni allergiche .

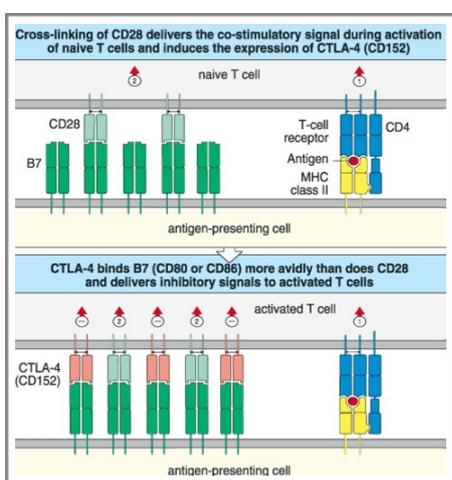
- Th17

Sono un'ulteriore sottopopolazione caratterizzata dalla produzione di IL-17 , ma secernono anche IL-21 e IL-22 ; non producono né IFN-gamma , né IL-4 . Hanno la funzione di proteggere contro le infezioni di batteri extracellulari e fungine reclutando neutrofili e altri leucociti . I CD4+ naive sono indotti a differenziarsi in Th17 dopo stimolazione da parte dell'antigene in presenza di TGF-B , IL-6 e IL-1 ; la citochina IL-23 favorisce la loro sopravvivenza .

- T-Regolatori

La tolleranza periferica T è un processo immunologico dimostrato nell'autoimmunità , nel cancro , nelle infezioni , nei trapianti e nelle allergie . E' stata individuata una famiglia eterogenea di cellule T ad attività regolatoria che gioca un ruolo chiave nella tolleranza periferica . Si tratta di popolazioni di cellule T , sia naturali che inducibili , diverse tra loro nello sviluppo , specificità , meccanismi d'azione . Le Naturali necessitano CD4+ CD25+ Foxp3 Treg e si sviluppano nel timo . Poi per le inducibili troviamo Tr1 e Th3 ; Tr1 produce IL-10 è indotto dall'interazione con le DC in presenza di citochine immunosoppressive , le Th3 producono oltre alla IL-10 anche TGF-Beta e si trovano usualmente a livello delle mucose ; sono dette indotte , perché l'espressione di Foxp3 è indotta dal TGF-Beta .

- T-Reg naturali CD4+ CD25+

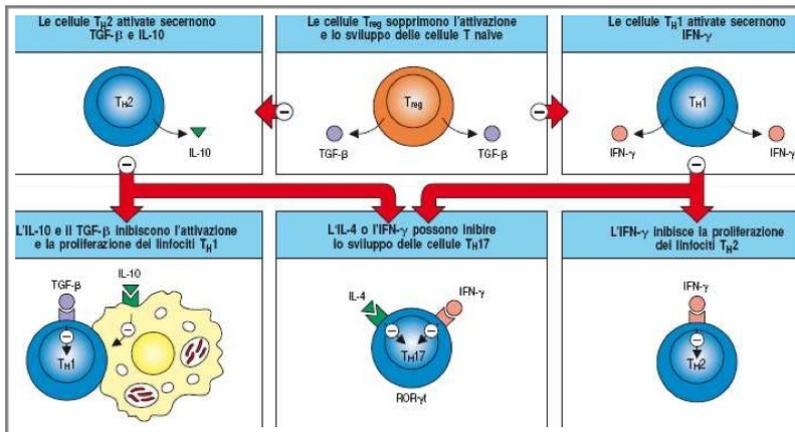
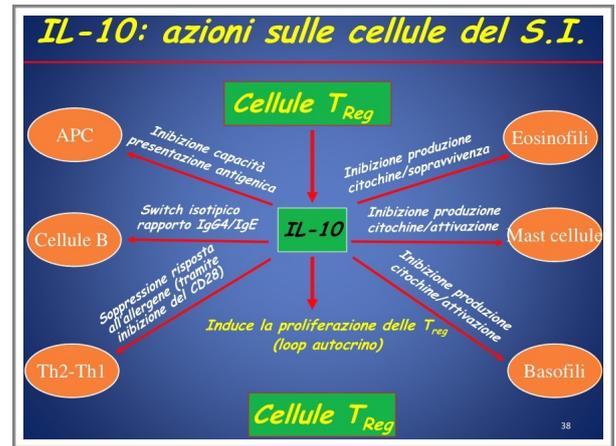
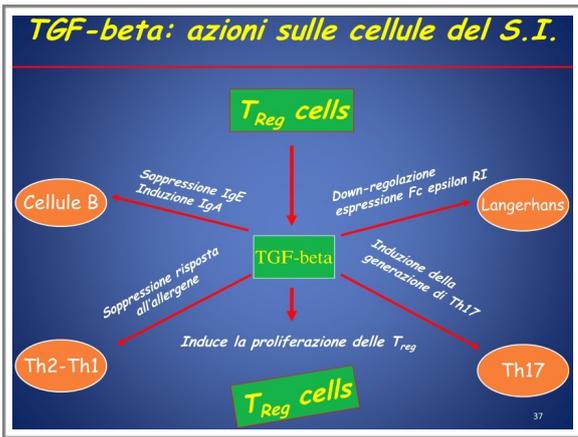


Originano dal timo , esprimono Foxp3 , CD62L (L-Selectina) ed agiscono soprattutto mediante meccanismi da contatto che coinvolgono CTLA-4 , TGF-Beta di membrana e rilasciano anche citochine come IL-10 e TGF-Beta . Prevengono risposte patologiche verso antigeni self e non self ed i fenomeni autoimmuni ; nell'uomo la loro presenza è ridotta nelle malattie autoimmuni ; sopprimono le risposte immuni ai tumori . Il legame del CD28 con B7 trasmette un segnale co-stimolatorio , mentre il legame tra il CTLA-4 e il B7 blocca l'attivazione della cellula .

- **Tr1** : sono coinvolte nella tolleranza periferica T-cellulare essendo capaci di re-direzionare una risposta immune inappropriata verso allergeni o autoantigeni ; possono

essere indotte dalla presenza di IL-10 prodotta da cellule dendritiche immature ed utilizzano vari meccanismi soppressivi , primi tra tutti la produzione di IL-10 ed in misura minore di TGF-Beta .

- **Th3** : sono caratterizzate da una prevalente produzione di TGF-Beta e da una minore produzione di IL-10 dopo attivazione con determinati antigeni (orali) ; la produzione di TGF-Beta induce un incremento di IgA e dà una spiegazione del ruolo di queste cellule nel contesto dell'immunità periferica mucosale verso antigeni nei soggetti sani .



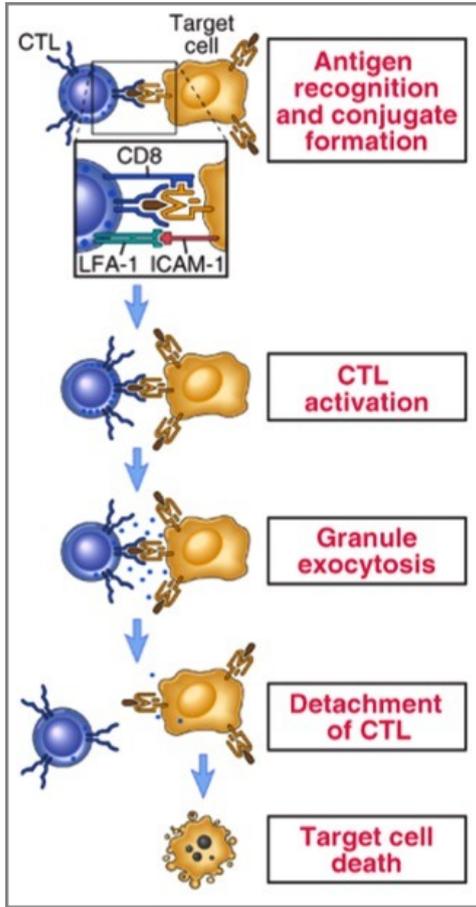
Ciascun sottogruppo dei linfociti CD4+ può regolare la differenziazione degli altri .
(immagine)

Linfociti T CD8+ effettori : linfociti T citotossici

Sono i linfociti effettori che eliminano direttamente la cellula bersaglio per eradicare l'infezione .

E' antigene-specifica e contatto-dipendente . Uccidono solo le cellule che esprimono MHC I con l'antigene legato ; non uccidono né danneggiano le cellule adiacenti a quella danneggiata , né

danneggiano loro stessi , assicurando la specificità della risposta ; questo grazie alla formazione della sinapsi immunologica .



Il CTL lega la cellula bersaglio con il TCR , col corecettore CD8 e con molecole di adesione come l'integrina LFA-1 (che lega ICAM-1) . Queste strutture , in aggiunta dell'aggregazione di altri recettori e altri ligandi , contribuiranno alla formazione della sinapsi immunologica ; un ambiente ristretto e limitato in periferia dalle integrine . Questo crea un microambiente all'interno del quale si sviluppa l'azione dei citotossici e restringendo il campo di azione , evita danni collaterali che potrebbero essere causati dal rilascio degli enzimi contenuti all'interno del CD8+ .

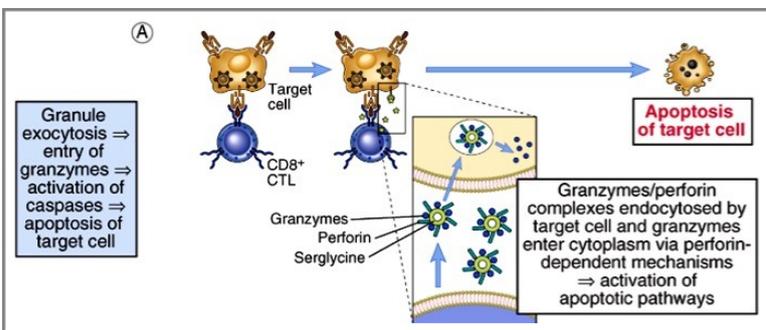
Le citochine e altri segnali necessari per la differenziazione dei CD8 naive , non sono invece necessari per le funzioni effettrici dei CTL .

Una volta che i linfociti T CD8+ specifici per un determinato antigene si sono differenziati in CTL funzionanti possono uccidere qualsiasi cellula nucleata che presenti l'antigene senza ulteriori stimoli differenziativi .

Entro 2-6 h che il CD8+ ha legato la cellula bersaglio , questo trasmette un colpo letale al bersaglio , o bacio della morte .

Questo avviene principalmente rilasciando delle proteine citotossiche dei propri granuli , che vengono rilasciati inducendo l'apoptosi . Vediamo quindi il legame delle integrine , cui segue una riorganizzazione del citoscheletro , in modo tale che i microtubuli possano veicolare i granuli verso la

sinapsi , determinando la fusione delle membrane e l'esocitosi .



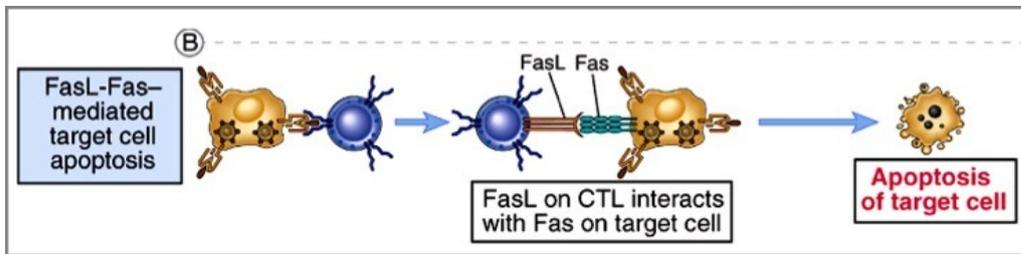
I granuli contengono **Granzimi** (A,B,C ; proteine sieriche che scindono le proteine in corrispondenza dei residui di aspartato) , poi **Perforina** , una molecola omologa a C9 del complemento , e poi ancora la **Serglicina** , che serve ad assemblare i complessi che contengono

Granzima e Perforina .

- 1) Può essere rilasciato il granzima dopo che la perforina ha bucato la membrana bersaglio , così da attivare una cascata che porta ad apoptosi .

- 2) Può ancora essere che i complessi formati da granzima e perforina vengano rilasciati nella sinapsi , poi vengano internalizzati in endosomi , e da lì la perforina buchi l'endosoma per la fuoriuscita del granzima che attiva la cascata apoptotica .

Non è chiarissimo ancora questo evento .



- 3) I CD8+ attivi possiedono sulla propria membrana Fas Ligando che andrebbe a legare il recettore omonimo sulle APC determinando la morte apoptotica .

L'obiettivo comune è quello di avviare una cascata apoptotica che porti la cellula alla morte , in modo da eradicare il serbatoio di infezione . Dopo aver dato il bacio della morte o colpo letale , il CTL si stacca dalla cellula bersaglio , facilitato dalla riduzione di affinità delle molecole accessorie per i propri ligandi , tutto prima che vada incontro alla morte .

Linfociti T memoria

Le risposte T generalmente portano alla generazione di cellule T di memoria , specifiche per un determinato antigene e possono persistere per anni .

Sono responsabili della maggiore rapidità ed efficacia con cui avvengono le risposte secondarie per lo stesso antigene ; possono derivare da CD4+ o anche da CD8+ a diversi livelli differenziativi . Possono derivare da precursori CD4+ quando ancora non sono Th1 o Th2 e quando riattivati mantengono quindi la potenzialità di poter scegliere la giusta via differenziativa ; altri possono derivare invece da Th1 o Th2 .

I linfociti di memoria possono dividersi in due sottopopolazioni :

- 1) Memoria centrali che esprimono CCR7 e L-Selectina e migrano ai linfonodi ; proliferano quando stimolati dall'antigene molto rapidamente .
- 2) Memoria effettori che non esprimono quelle proteine e migrano negli organi periferici (soprattutto mucose) ; sotto stimolazione antigeniche producono IFN-gamma senza proliferare però .

Capitolo 14

Meccanismi effettori dell'immunità umorale

La funzione dell'immunità umorale è quella di difendere dai microrganismi extracellulari e da tossine da essi prodotte .

Venne scoperta da von Behring e Kitasato nel 1890 , quando la protezione del siero di un individuo immunizzato poteva essere passato ad un individuo non immunizzato .

Combatte microrganismi extracellulari , miceti e persino alcuni virus che possono essere intercettati prima che infettino una cellula o dopo , quando ha ucciso una cellula e ne va ad infettare un'altra .

Principali caratteristiche

La funzione degli anticorpi è di neutralizzare ed eliminare i microrganismi infettivi e le tossine prodotte . Gli anticorpi vengono prodotti da linfociti B e plasmacellule negli organi linfoidi secondari e nel midollo osseo e svolgono la loro funzione in siti anatomici molto distanti ; infatti a differenza dei linfociti T , che non possono attraversare la placenta e mucose , le Ig possono raggiungere qualsiasi distretto anatomico .

Molte funzioni sono mediate dalle regioni costanti , nonostante la specificità sia delle regioni variabili e quindi diversi isotipi di Ig svolgono funzioni effettrici diverse . Questo è importante in quanto si ricerca la cellula migliore per controbattere il patogeno . È permesso dallo switch isotipico , indotto da citochine specifiche degli T Helper e da ligandi come CD40-CD40L .

Neutralizzazione dei microrganismi e delle tossine microbiche

Legando microrganismi e tossine , gli anticorpi impediscono a questi di legarsi ai recettori cellulari in un fenomeno chiamato impedimento allosterico . Inoltre possono anche legare il microrganismo alterandone la conformazione della superficie , quindi rendendolo incapace di legare il recettore cellulare in un fenomeno chiamato effetto allosterico .

Gli anticorpi neutralizzanti più efficaci sono quelli dotati di un'affinità maggiore , come quelli provenienti dalla maturazione dell'affinità .

Opsonizzazione e Fagocitosi mediata da anticorpi

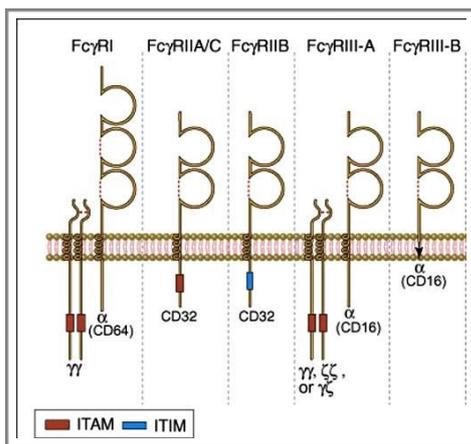
I fagociti fagocitano i microrganismi che riconoscono grazie ai propri recettori, ma grazie agli anticorpi questa funzione la svolgono ancora meglio; le IgG vanno a rivestire i microrganismi, favorendone l'eliminazione, la fagocitosi, grazie al recettore Fc per i fagociti; inoltre i microrganismi possono essere opsonizzati anche dal complemento, la subunità C3b. La fagocitosi viene potenziata quando questi due meccanismi si verificano contemporaneamente.

Il processo di rivestimento del microrganismo è detto **opsonizzazione** e le molecole che partecipano opsonine.

- Recettori per Fc dei fagociti

I recettori sono responsabili del riconoscimento delle porzioni Fc e favoriscono quindi la fagocitosi.

I recettori coinvolti nel processo di fagocitosi degli antigeni opsonizzati da IgG sono chiamati Fc-gamma-R e ne esistono di tre tipi RI, RII e RIII (esistono anche varie sottoclassi)



- Fc-gamma-RI o CD64

Nell'uomo riconosce le catene gamma delle IgG1 e 3 con elevata affinità. È formato da una catena alfa (che possiede tre domini Ig N-Terminali), responsabile del legame all'FC, associata con ponti disolfuro ad un omodimero di due catene gamma che hanno la stessa funzione dell'omodimero Zeta del complesso del TCR, perché andranno a trasdurre il segnale, infatti conterrà i domini ITAM. Il legame agli antigeni opsonizzati favorirà la fagocitosi, con internalizzazione in fagosomi che fondendosi coi lisosomi creano i fagolisosomi, dove verranno eliminati. I macrofagi attivati

da IFN-gamma (ne promuove l'espressione) esprimeranno maggiormente questi recettori.

L'attivazione di questo recettore porta all'attivazione della famiglia Pp160src che forforila i domini ITAM che legano così Syk la quale dà il via alla trasduzione. I macrofagi a questo punto saranno stimolati a produrre molecole microbicide, come gli intermedi reattivi dell'ossigeno ROS e ossido nitrico NO; leucociti attivati inoltre secerneranno enzimi idrolitici e intermedi reattivi nell'ambiente esterno, in modo da portare danni collaterali come danneggiamento dei tessuti nell'ipersensibilità.

- Fc-gamma-RIIB o CD32

Del secondo tipo ne sono presenti tre di tipi, e la sottoclasse B andrà a legare principalmente cellule B, ma anche cellule dendritiche, macrofagi e anche mastociti. Questo recettore è fondamentale perché conterrà residui ITIM nella sua porzione citoplasmatica, che servirà a trasdurre segnali di inibizione.

- Fc-gamma-RIII o CD16

Questa terza classe è specifica delle NK e lega le IgG solamente quando si tratta di aggregati , altrimenti lega a bassa affinità . Media il fenomeno della citotossicità cellulare mediata da anticorpi ADCC , quindi questo fenomeno è attivato solamente dopo opsonizzazione . Il legame del recettore con l'IgG andrà a favorire la produzione di IFN-gamma e l'espulsione dei granuli .

Gli elminti sono troppo grossi per essere fagocitati , e possono essere uccisi solamente da una proteina basica maggiore contenuta nei granuli degli eosinofili e le IgG e IgA che hanno le porzioni Fc in grado di legare gli eosinofili andranno a stimolare questo processo di degranulazione .

Il sistema del complemento

E' uno dei principali meccanismi dell'immunità umorale , ma anche innata . Furono scoperti da Jules Bordet , dimostrando che se si incubava un batterio a 37°C assieme ad anticorpi specifici per quel batterio , questo veniva lisato ; se lo stesso batterio veniva incubato con anticorpi riscaldati a temperature superiori a 56° , questo non si lisava ; visto che gli anticorpi sono termostabili , doveva esistere un qualche fattore termolabile che dovesse mediare questo processo di lisi del batterio .

Questa componente era il complemento . Sono delle proteine solubili e di membrana che interagiscono tra loro e con le altre componenti del sistema immunitario per generare delle reazioni che hanno come scopo comune quello di eliminare i microrganismi .

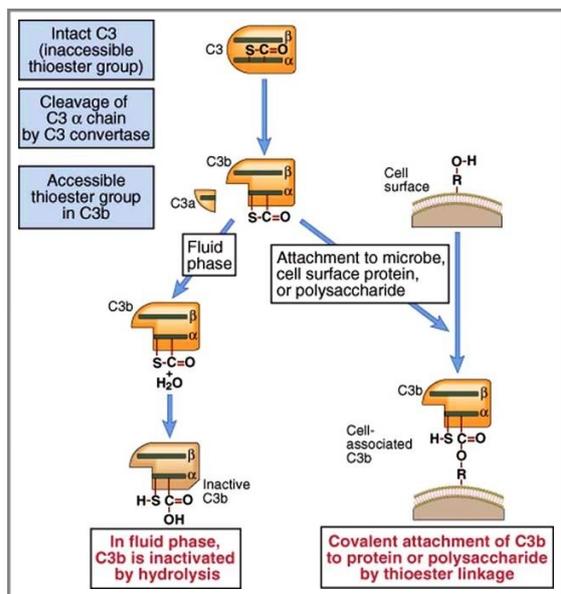
L'attivazione del complemento prevede una cascata di scissioni proteolitiche , permettendo così di amplificare il processo , poiché ogni molecola attivata , sarà poi in grado di attivare molte altre molecole . Queste subunità create sono chiamate "b" e "a" , dove "b" è generalmente più grande , tutte tranne nel caso di C2 , in cui la forma "a" è più grande .

Il complemento può essere attivato attraverso tre vie principali , due vie che non richiedono la presenza degli anticorpi , quindi anticorpi-indipendenti e sono la via alternativa e la via lectinica , e poi una via anticorpo-dipendente , la via classica .

Queste tre vie avranno in comune tre punti fondamentali : l'assemblaggio di un complesso enzimatico chiamato C3-convertasi , di un complesso enzimatico chiamato C5-convertasi , differendo tuttavia nel modo in cui arrivano a queste tappe ; e l'evento finale , che sarà quello della via litica .

- Attivazione della via **alternativa**

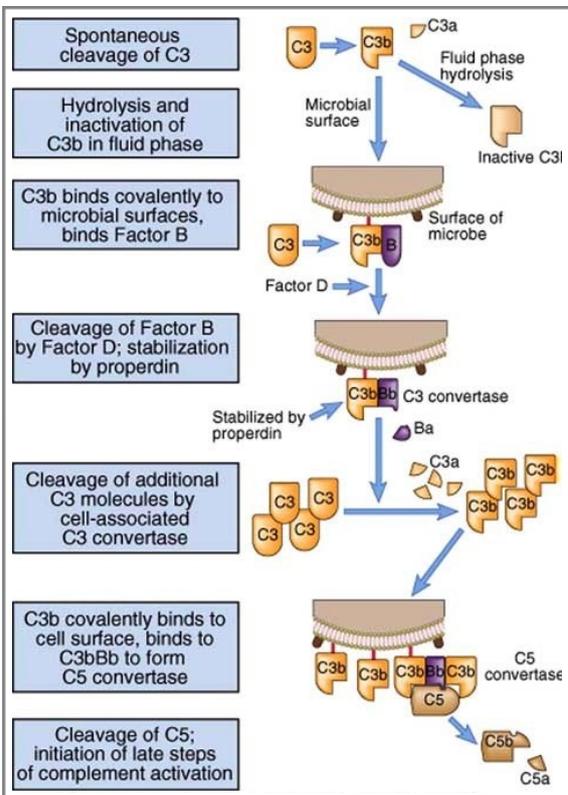
Questa via come detto è anticorpo indipendente . Può essere attivata dal riconoscimento di alcune componenti della parete microbica , LPS , polisaccaridi ripetuti , cellule infettate da virus (EBV e



influenza), Immunocomplessi IgA-Ag, alcune catene leggere e un fattore del veleno del cobra CVF. Comincia con una componente del complemento o C3 che viene scissa spontaneamente in due subunità, una che andrà in forma solubile chiamata C3a (anafilotossina) e una subunità più grande, chiamata C3b (più grande). Questo momento è importante, perché la componente C3 ha un gruppo tioesterico altamente reattivo, che però non può legare la membrana del batterio proprio per la presenza del frammento C3a; quando rimosso questo frammento viene liberato il sito reattivo e a questo punto C3b avrà due vie: una via in cui si va a legare alla membrana del batterio, perché andrà a formare dei legami con i gruppi amminici e

idrossilici delle proteine e dei polisaccaridi presenti nella membrana, dei legami covalenti amminici o esterici; però se non va a formare questo legame, viene rapidamente idrolizzata, infatti va a reagire con una molecola di H₂O che blocca nuovamente il suo sito reattivo. Quella che ci interessa è la prima.

Legato alla membrana C3b, verrà modificata la sua conformazione, infatti il suo sito tioesterico



andrà a spostarsi di 85 A°, causando l'esposizione, oltre che del gruppo tioesterico, anche di un sito per una proteina plasmatica, o fattore B, che una volta legatosi a C3b viene clivato ad opera di una serina-proteasi, o fattore D, rilasciando due frammenti nuovamente. Il frammento Ba che andrà in forma solubile e il frammento Bb, che invece rimarrà legato al C3b, a formare un complesso C3b-Bb, un complesso enzimatico chiamato **C3-Convertasi della via alternativa**. Questo complesso andrà a clivare in modo massiccio numerose C3, andando a generare numerose C3b, di cui alcune andranno ad operare nella via classica, mentre altre (quindi le stesse prodotte) serviranno alla C3 per formare un ulteriore complesso. La C3 convertasi della via alternativa, si associa ad una delle C3b generate per formare un complesso enzimatico chiamato **C5-convertasi della via alternativa** che sarà deputato a clivare C5 ed innescare così la via litica.

Questa attivazione stabile però si può formare esclusivamente sulla parete del batterio, ma mai sulla parete dell'ospite, perché ci sono delle proteine regolatorie che controllano e tengono a freno le

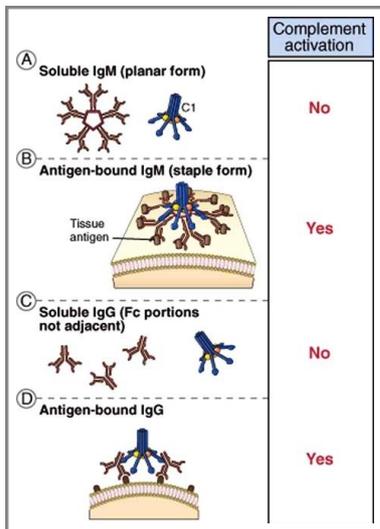
potenzialità del complemento e sono espresse specificatamente dall'ospite e non dal microrganismo . Inoltre vediamo la properdina , che può invece stabilizzare la C3 convertasi , ma questa azione avviene preferenzialmente sulla superficie microbica e non sull'ospite , quindi ancora una volta protegge l'ospite ; la **properdina** è l'unico regolatore positivo del complemento finora identificato .

- Attivazione della via **classica**

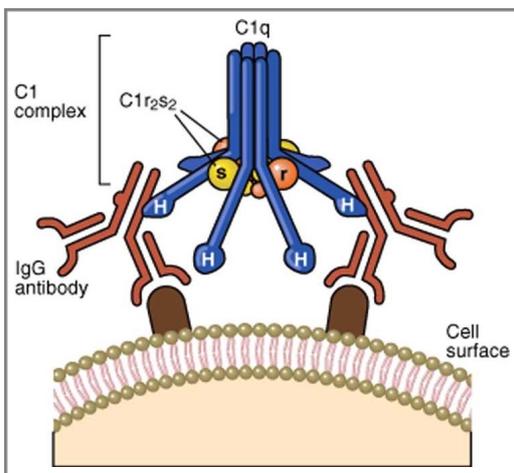
La via classica viene attivata dal legame degli anticorpi IgG e IgM con il microrganismo e le porzioni Fc degli anticorpi alla componente C1 del complemento . Il complemento C1 andrà a legare i domini Ig costanti delle catene pesanti , rispettivamente C3 per IgM e C2 per IgG .

Altri attivatori del complemento possono essere SAP (proteina amiloide sierica) , la proteina C reattiva e le membrane delle cellule apoptotiche .

La componente C1 è un complesso multimerico formato dalle subunità C1q , C1r e C1s .



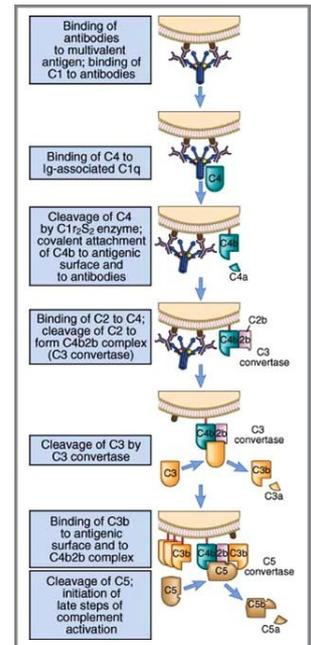
C1q ha la forma di un ombrello ; è formato da sei catene disposte radialmente , che terminano con una testa globulare e sono tutte connesse centralmente da uno stelo centrale strutturalmente simile al collagene . Ogni testa globulare può legare i domini degli immuno-complessi e soprattutto per essere attivato il C1 , devono essere legate almeno due porzioni Fc , quindi per quanto riguarda IgG , dovranno essere almeno due gli anticorpi , in quanto dotati solamente di un segmento Fc ; le IgM sono pentameriche , ma se non legano l'antigene , non modificano la propria conformazione in modo tale da poter legare C1q , ma quando legano l'antigene , diventano molto più efficienti delle IgM e oltretutto possono legare pure due C1q contemporaneamente .



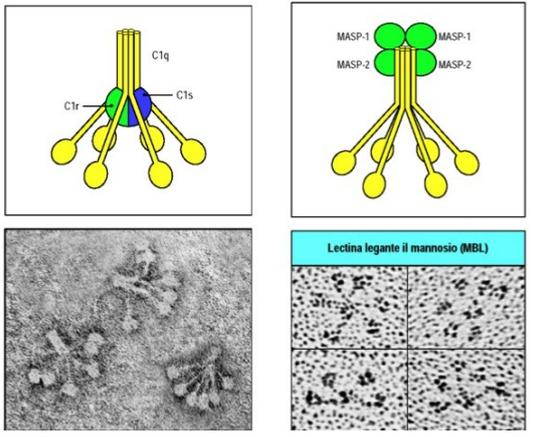
C1r e C1s all'interno di C1 sono un tetramero , quindi composte da due subunità ciascuna . Quando due o più teste globulari legano l'immuno-complesso , si attiva C1r , la quale va a clivare C1s , attivandolo . C1s a questo punto va a clivare e attivare un'altra componente del complemento C4 , generando un frammento più piccolo , C4a e uno più grande C4b che rimane adeso alla membrana (come C3b) . C4b avrà sempre quei domini tioesterici in grado di legare la membrana microbica , facendo continuare così la cascata del complemento .

C1s andrà poi a clivare un altro componente , che ha una forte tendenza a complessarsi col C4b , o , C2 ; quindi si generano due frammenti , di cui però il più grande si chiama C2a e rimane attaccato al C4b , mentre il più piccolo , o C2b andrà in forma solubile (questa è l'unica eccezione) .

Questo complesso enzimatico **C4b-C2a** formerà la C3 convertasi della via classica e come nella via alternativa andrà a clivare le C3 , quindi generando molte subunità C3b , in grado di far parte dell'alternativa o di entrare a far parte di un nuovo complesso , la C5 convertasi della via classica . La C4 avrà la funzione di legare C3 , mentre C2 avrà la funzione catalitica del taglio . Questa infatti viene a formarsi dall'unione della C3 convertasi classica , con una subunità C3b , quindi **C4b-C2a-C3b** (C3b può anche provenire dalla via alternativa) .



Il C1 e l'MBL hanno una struttura simile



-Attivazione della via della Lectinica

La via lectinica è anticorpo indipendente , come la via alternativa , ma le tappe che portano alla C5 convertasi sono simili a quelle della via classica . Comunque la via viene innescata dal riconoscimento di polisaccaridi microbici , attraverso le collettine e le ficoline circolanti (queste riconoscono N-acetil-glucosammina) .

La MBL ha una struttura simile alla C1q , solamente che le subunità C1r e C1s sono sostituite dalle MASP (MBL Associated Serin-Protease) e in particolare dalle MASP-2 e

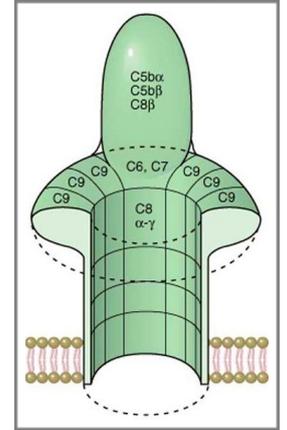
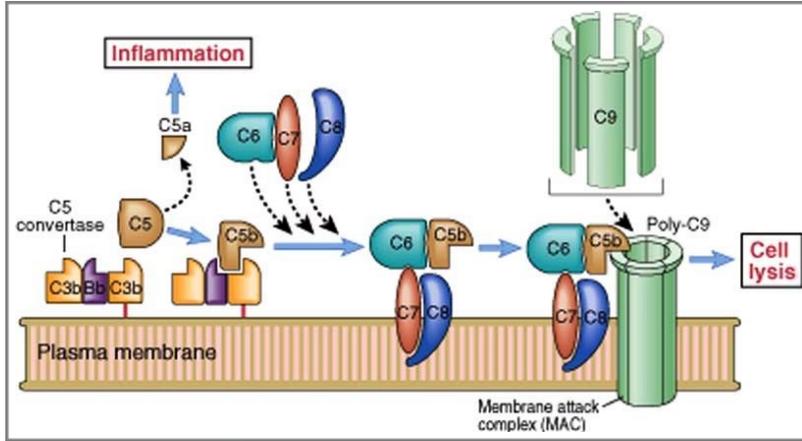
MASP-3 . Queste due formano quindi il tetramero come nella via classica , che vanno a clivare C4 e C2 ; quindi le uniche differenze sono il legame antigene dipendente , perché vanno a riconoscere polisaccaridi e poi l'assenza di C1r e C1s , perché abbiamo MASP-2 e 3 .

- Via litica

Tutte e tre le vie quindi hanno portato alla formazione di una C5-convertasi , in grado di far continuare la cascata del complemento per l'evento finale , la lisi del patogeno . La sequenza terminale porterà alla formazione del MAC , o complesso di attacco alla membrana .

La C5 convertasi catalizza il taglio di C5 in C5a che andrà in forma solubile e C5b che invece andrà a legare altre componenti del complemento .

Queste componenti saranno C6, e C7 inizialmente, dove la componente C7 in questa conformazione trimerica si inserisce nella membrana del batterio, essendo C7 idrofobico. A questo punto andrà a fungere da recettore per C8, che è composto da tre catene, una (beta) che andrà a legarsi al complesso C5-C6-C7 e le altre due (alfa, gamma) che invece andrà ad inserirsi nella



membrana, stabilizzando così tutto il complesso. Il MAC però ancora non è assemblato, perché manca la struttura più importante, o C9 che è formato da molte subunità, le quali tendono a polimerizzare col complesso C-5/8. C9 è una proteina plasmatica e forma pori nella membrana del microorganismo e saranno circa 12-15 le molecole di C9 nella membrana, che assieme a due catene C8 e una di C6 e C7 andranno a formare un tubo; C8 beta con C5b alfa e beta andrà a formare una struttura che protrude al di sopra del poro.

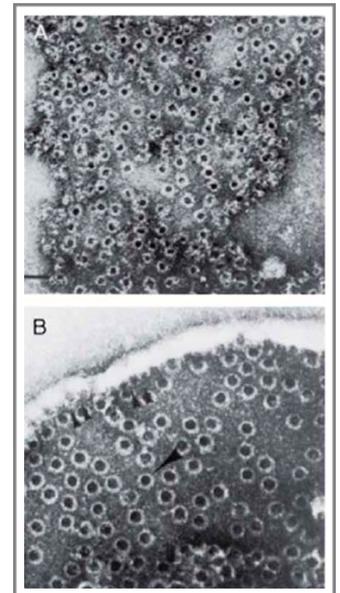
Il MAC andrà a favorire l'ingresso all'interno del patogeno di acqua, scatenando così la lisi provocata da un rigonfiamento osmotico.

Il MAC andrà a formare dei fori della grandezza di 100 Å che sono molto simili a quelli formati dalla perforina (NK e CTL), che avranno però una grandezza maggiore (160 Å)

- Recettori per le proteine del complemento

Molti effetti biologici del complemento sono mediati dai recettori e sono:

- Recettore per il complemento di tipo 1, o **CR1** o CD35; questo recettore che viene espresso dalle cellule ematiche, quali eritrociti, neutrofili, monociti, eosinofili e linfociti T e B, svolge principalmente la funzione di promuovere la fagocitosi di antigeni opsonizzati da C3b e C4b. La fagocitosi come precedentemente detto viene attivata meglio quando contemporaneamente viene attivato anche il recettore Fc-gamma, quindi quando avviene anche il riconoscimento delle IgG. Viene espresso dagli eritrociti, in modo tale che questi possano legare gli immunocomplessi, per



Recettore	Specificità	Funzioni	Tipi cellulari
CR1 (CD35)	C3b, C4bi C3b	Promuove degrado C3b e C4b Stimola fagocitosi Trasporto eritrocitario di immunocomplessi	Eritrociti, macrofagi, monociti, leucociti polimorfonucleati, Cellule B, FDC
CR2 (CD21)	C3d, iC3b, C3dg Epstein-Barr virus	Parte del corecettore per cellule B Recettore virus Epstein-Barr	Cellule B, FDC
CR3 (Mac-1) (CD11b/ CD18)	iC3b	Stimola fagocitosi	Macrofagi, monociti, leucociti polimorfonucleati, FDC
CR4 (gp150, 95) (CD11c/ CD18)	iC3b	Stimola fagocitosi	Macrofagi, monociti, leucociti polimorfonucleati, FDC
Recettore C5a	C5a	Il legame di C5a attiva la proteina G	Cellule endoteliali, mastociti, fagociti
Recettore C3a	C3a	Il legame di C5a attiva la proteina G	Cellule endoteliali, mastociti, fagociti

dirigersi alla milza , ove i fagociti andranno a rimuoverli e così gli eritrociti possono ritornare in circolo ; inoltre CR1 è anche un regolatore del complemento .

- Recettore per il complemento di tipo II , o **CR2** o **CD21** , questo recettore viene espresso principalmente sulla superficie dei linfociti B , perché funzionerà come corecettore per il BCR , andando a trasdurre quei segnali di attivazione per i linfociti B (è lì associato con **CD19** e **CD81** chiamato anche **TAPA-1**) . Viene espresso anche

da cellule follicolari dendritiche e va a legare specificamente **C3d** , **C3dg** e **iC3b** . Il primo è importante nella via di attivazione dei B (principalmente) , **iC3b** e **C3dg** saranno espressi dalle **FDC** che grazie a questi recettori intrappolano gli immunocomplessi all'interno dei centri germinativi .

Inoltre questo recettore è importate a livello patologico , in quanto fungerà da recettore di membrana per il virus di Epstein-Barr .

- Recettore per il complemento di tipo 3 , o **CR3** o **Mac-1** o **CD11bCD18** ; questo recettore appartiene alla famiglia delle integrine , e funge da recettore per **iC3b** favorendo la fagocitosi del microorganismo . **Mac-1** è espresso sulla superficie di neutrofili , fagociti , mastociti e **NK** .

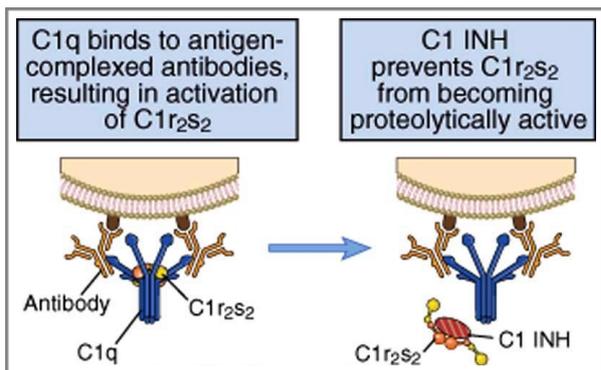
E' costituito da una catena alfa (**CD11b**) associata non covalentemente ad una catena beta (**CD18**) , identica alla catena beta di **LFA-1** e **p150,95** /altre due integrine) .

Mac-1 lega anche **ICAM-1** nell'endotelio , favorendo il reclutamento .

- Recettore per il complemento di tipo 4 , o **CR4** o **p150,95** o **CD11cCD18** , che è molto simile al terzo sia per struttura che per funzione , infatti differiscono solamente per la catena alfa che invece di essere **CD11b** , è **CD11c** . La funzione e il ligando sono gli stessi . Viene anche usato come marcatore delle cellule dendritiche .

- Recettori per **C5a** e **C3a** sono recettori che riconoscono **C5a** e **C3a** e sono membri della famiglia dei recettori associati a proteine G , con sette domini transmembrana e vengono espressi da endotelio , mastociti e fagociti .

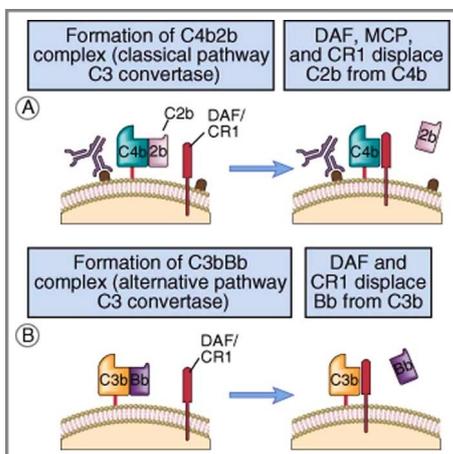
- Recettore per il complemento della famiglia delle Ig , questo recettore viene espresso dalle macrofagi del fegato , o cellule di Kupffer , dove lega C3b e iC3b , favorendo l'eliminazione dei batteri opsonizzati .
- Recettore SIGN-1 , che viene espresso dai macrofagi della zona marginale della milza e andranno a riconoscere i polisaccaridi di pneumococco .
- Regolazione dell'attivazione del complemento



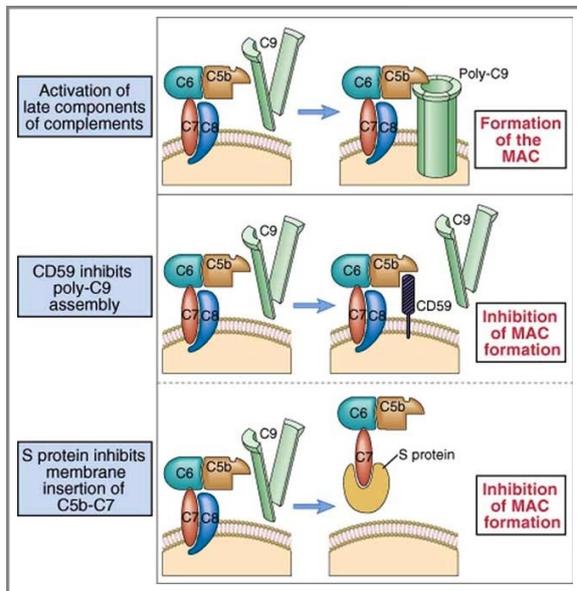
Il complemento è una componente del sistema immunitario molto potente e di conseguenza deve essere tenuto a freno , regolato , affinché le cellule dell'ospite non vengano danneggiate . La protezione è garantita da proteine circolanti chiamate RCA o regolatori dell'attività del complemento

Normalmente il complemento in circolo è a bassi livelli altrimenti l'ospite verrebbe danneggiato .

- 1) C1r e C1s vengono inibite da **C1 INH** , una serina proteasi che diventa il principale bersaglio dell'attività enzimatica di C1s , venendo così clivato e attivato va ad associarsi al tetramero C1r2-C1s2 inibendo così l'assemblaggio e limitandone la disponibilità per C1q (immagine) . Il deficit di questo regolatore causa una malattia autosomica-dominante ereditaria chiamata **edema angioneurotico ereditario** , caratterizzata da edema della cute e ostruzione delle vie aeree potenzialmente letale . In questa malattia è stato dimostrato che i mediatori principali sono il dominio proteolitico di C2 o C2 chinina e la bradichinina ; C1 INH inibisce non solo la chinina , ma anche altre serina-proteasi plasmatiche che promuovono la formazione di bradichinina .



- 2) Può essere inibito anche l'assemblaggio degli enzimi C3 convertasi della via classica e alternativa . Infatti ci sono regolatori che si legano a C3b e C4b che impediscono il legame alla membrana dei componenti Bb e C2a . Le proteine regolatrici per C3b sono il fattore H , oppure sono proteine di membrana come MCP (CD46) , CR1 e **DAF** . Per c4b invece sono DAF , CR1 e una proteina plasmatica C4BP (C4 Biding Protein) . Come detto ognuna di queste può legarsi alle rispettive parti (C3b o C4b) impedendo così nuovi assemblaggi e bloccando l'attivazione del complemento .



DAF è espressa dalle cellule endoteliali ed eritrociti , come proteina di membrana legata tramite glicofosfatidilinositolo ; la carenza di un enzima necessario per formare questo legame (anche per CD59) , porta a una sindrome chiamata **emoglobinuria parossistica notturna** . Questa è un' anemia accompagnata dall'emissione ricorrente di urine scure (eliminazione di emoglobina per via renale) . Il termine "parossistica" si riferisce al diverso grado di emolisi che si riscontra nei tempi diversi di un paziente ; le urine possono inoltre apparire più scure di notte , ma l'emoglobinuria può anche manifestarsi durante il resto della giornata ; il termine "notturno" si riferisce alla credenza che

l'emolisi fosse scatenata dall'acidosi durante il sonno che attivava il complemento ad emolizzare una membrana eritrocitaria non protetta ed anomala (affermazione confutata) . L'emoglobinuria parossistica notturna si osserva frequentemente in soggetti giovani e esordisce con i segni dell'anemia (pallore,astenia) associati a emissione di urine scure alla notte (emoglobinuria) , insieme a fenomeni trombotici di varia natura (emolisi intravascolare) .

- 3) C3b può essere inoltre degradato dal fattore **I** , che svolge il suo compito solamente in associazione con le proteine regolatrici appena citate , che agiscono quindi da cofattori . Il clivaggio di C3b porta a formare iC3b , C3d e C3dg che non svolgono attività regolatoria , ma vengono riconosciuti da fagociti e cellule **B** (attivazione) .
- 4) Il MAC inoltre può essere inibito evitando che si formi il complesso ; questo è reso possibile da una proteina di membrana chiamata **CD59** che è legata alla membrana attraverso glicofosfatidilinositolo (come DAF) . CD59 va a legarsi al complesso C5/8 inibendo l'assemblaggio di C9 .
- 5) Un'altro meccanismo che evita che si formi il MAC è la proteina **S** , che andrà a prevenire l'inserimento del complesso C5/7 nella membrana , evitando l'attivazione del complemento .

- Funzioni del complemento

Come ampiamente detto promuove la fagocitosi e/o la lisi dei microrganismi e stimola l'infiammazione .

1) Opsonizzazione e fagocitosi

I microrganismi che hanno attivato la via classica o alternativa saranno opsonizzati da C3b, iC3b e C4b , che grazie all'interazione coi propri recettori favoriscono la fagocitosi .

C3b e iC3b sono opsonine riconosciute specificamente da neutrofilo e macrofagi , C3b e C4b si legano quindi a CR1 , mentre iC3b si lega a Mac-1 . La fagocitosi è aumentata se sono opsonizzati anche dalle IgG associate simultaneamente ai recettori Fc-gamma .

Inoltre anche IFN-gamma potenzia la fagocitosi dei macrofagi essendone la citochina principe .

2) Induzione della risposta infiammatoria

Quei frammenti che sono rimasti in forma solubile dopo i vari clivaggi andranno ad avere altre funzioni biologiche . C3a , C4a e C5a inducono infatti l'infiammazione acuta richiamando neutrofilo e mastociti nel focolaio di infezione , infatti C5a aumenta l'espressione delle molecole di adesione sugli endoteli , favorendo la fuoriuscita . Vengono chiamate anche anafilotossine , poiché scatenano a livello dei mastociti anafilassi . C5a è il più potente induttore della degranolazione dei mastociti , che rilasciano istamina ed eparina (riconosce il recettore per C5a a sette domini transmembrana) . Questo frammento inoltre stimola il metabolismo ossidativo dei neutrofilo e il rilascio di leucotrieni .

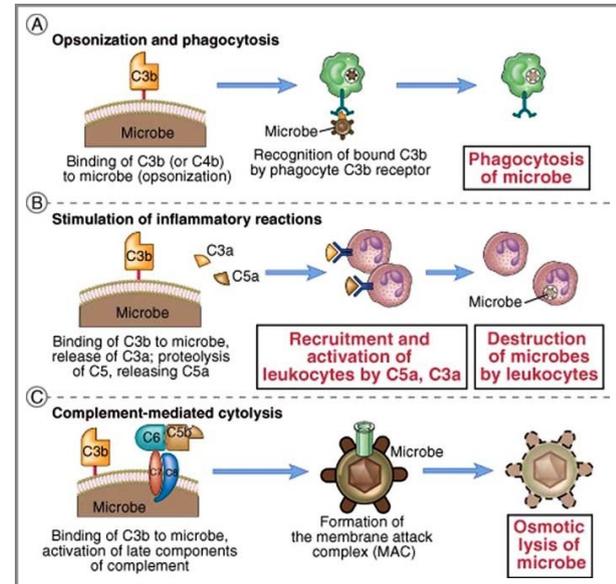
3) Citolisi mediata dal complemento

Molti microrganismi , durante il processo evolutivo si sono rafforzati , e molti anzi , la maggior parte dei patogeni ha evoluto pareti spesse , impenetrabili dal MAC , quindi la lisi mediata dal complemento sembra essere importante solamente per quei batteri che hanno una parete sottile , come i batteri del genere *Neisseria* .

4) Altre funzioni del complemento

- La proteina C3d derivata dal clivaggio C3 , va a legarsi a corecettore CR2 per rendere più efficiente l'attivazione dei linfociti B .

- Le proteine del complemento legano immunocomplessi e generando una risposta , generalmente si produce una piccola quantità di immunocomplessi circolanti , che possono depositarsi a livello della



parete vasale , provocando reazioni infiammatorie e danno tissutale . (immunocomplessi
ipersensibilità di tipo 3)

- Deficit del complemento

I pazienti con deficit di C1 , C2 , C3 e C4 sviluppano infezioni ricorrenti da batteri piogeni e
patologie da immunocomplessi (LES - Lupus Eritematoso Sistemico) .

I pazienti con deficit delle componenti del MAC come detto sviluppano infezioni da Neisseria .

