

**Corso di Immunologia - III anno**  
**Prof. Paolini**

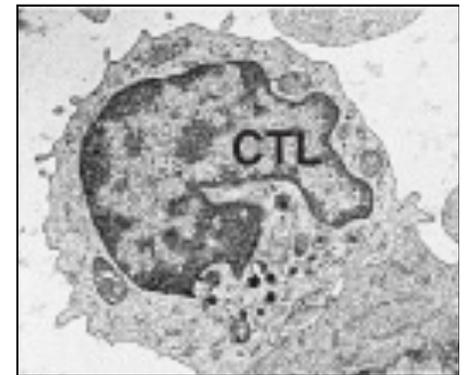
**Lezione 09/11/2023**

**"I linfociti T citotossici"**

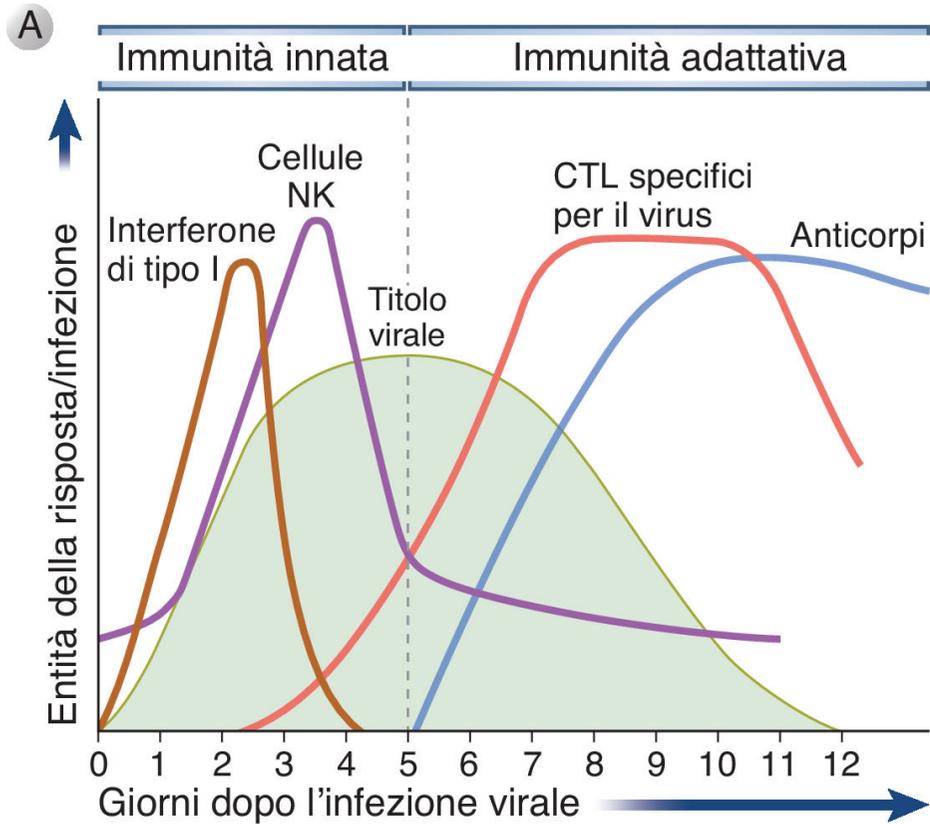
**Il materiale presente in questo documento viene distribuito esclusivamente ad uso interno e per scopi didattici.**

# La citotossicità linfocitaria

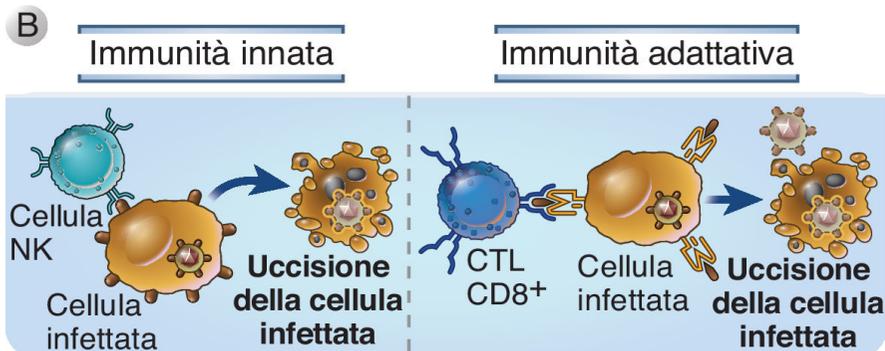
- Meccanismo effettore dell'immunità cellulo-mediata
- Diretto contro:
  - ❖ Cellule infettate (patogeni intracellulari)
  - ❖ Cellule tumorali
- Principali popolazioni di linfociti citotossici:
  - ❑ I linfociti T CD8+ CTL
  - ❑ Le cellule natural killer NK
- Differenti meccanismi di riconoscimento del bersaglio
- Stessi meccanismi litici

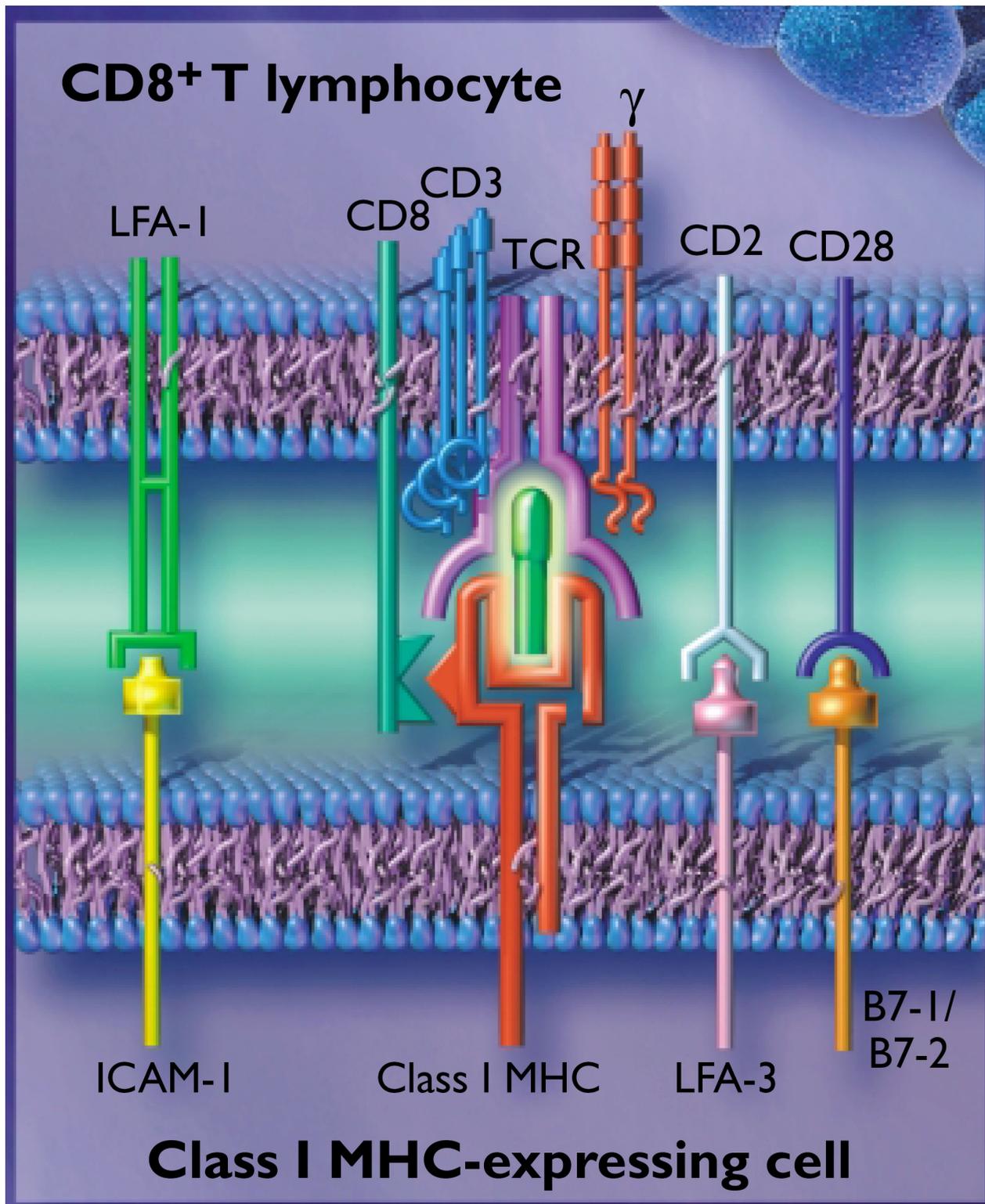


# Perché esistono differenti popolazioni di linfociti citotossici?



Strategie complementari  
nella difesa contro  
patogeni intracellulari!





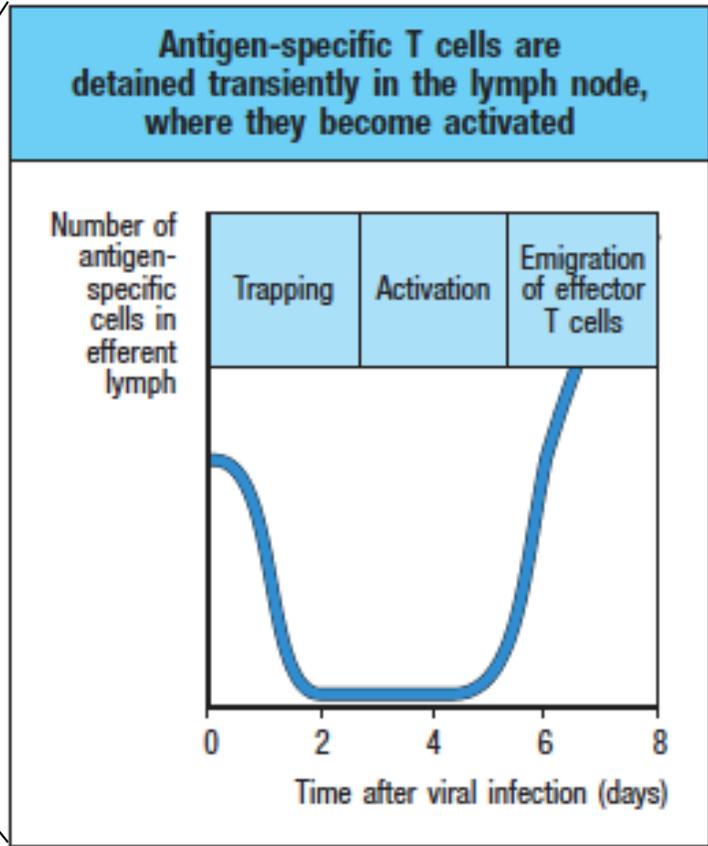
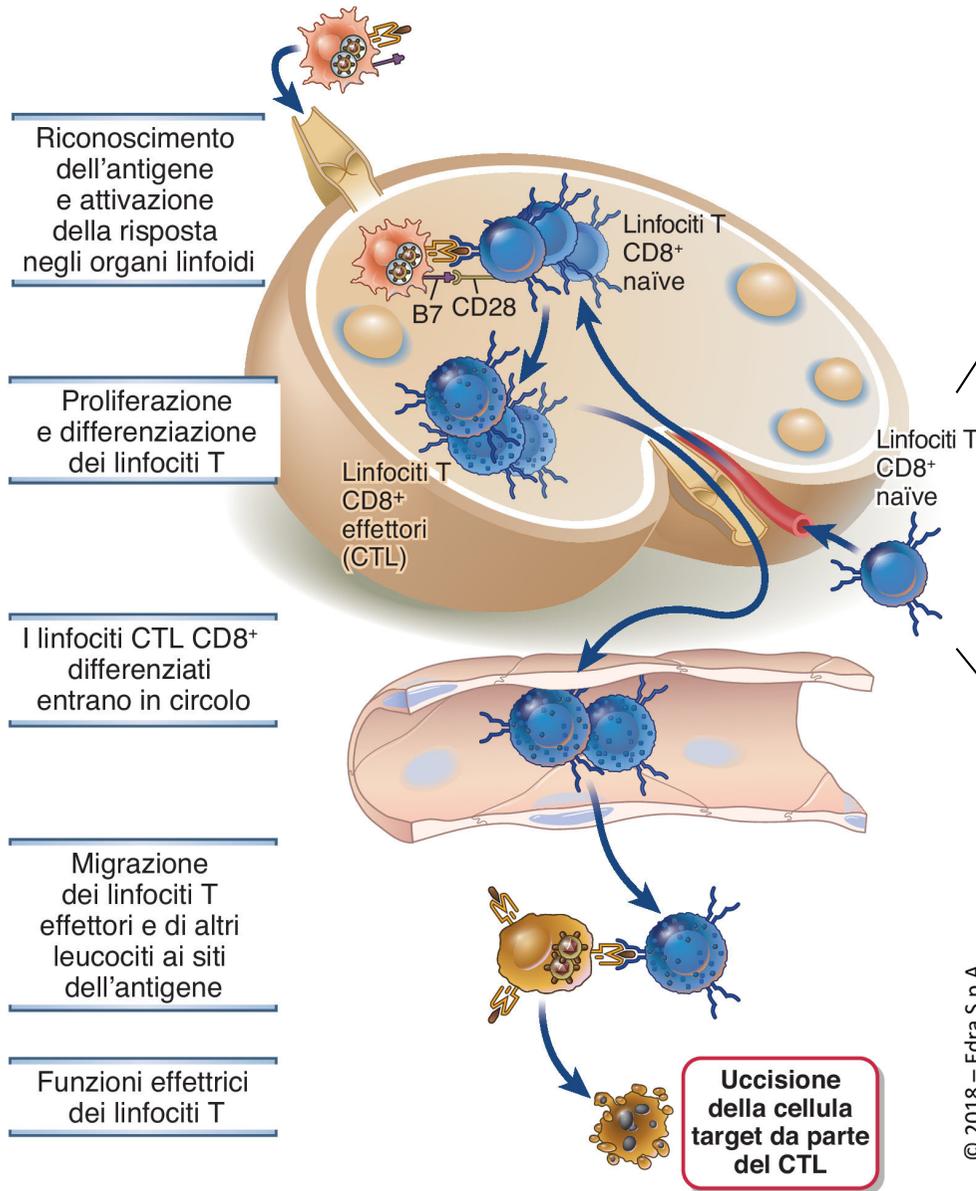
Il riconoscimento  
dei linfociti  
T CD8 è

specifico

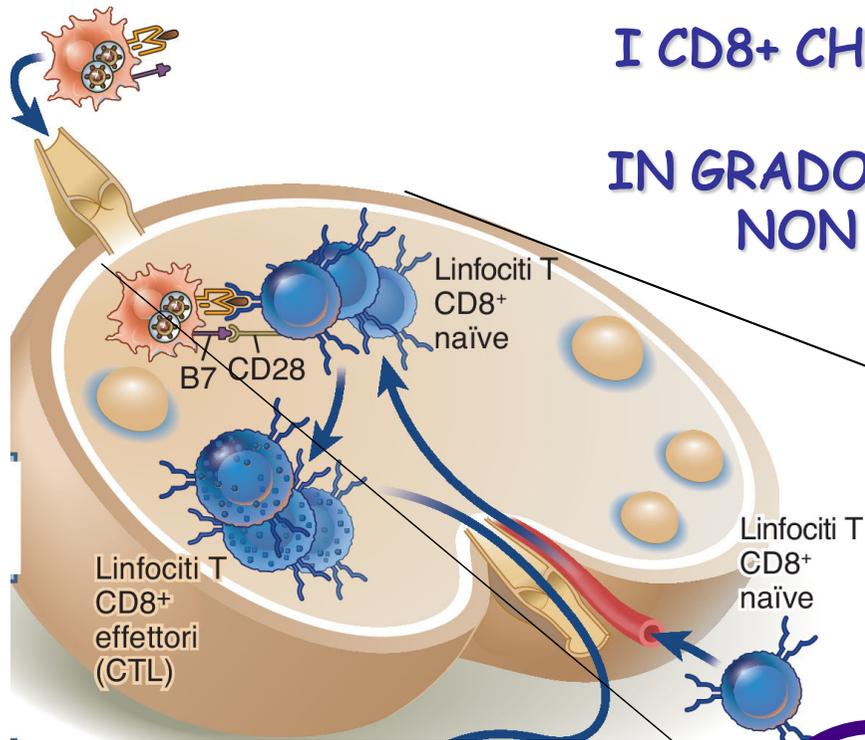
e

ristretto nei  
confronti di  
molecole MHC di  
classe I

# In corso di infezione i linfociti T naive specifici sono intrappolati e attivati nei linfonodi

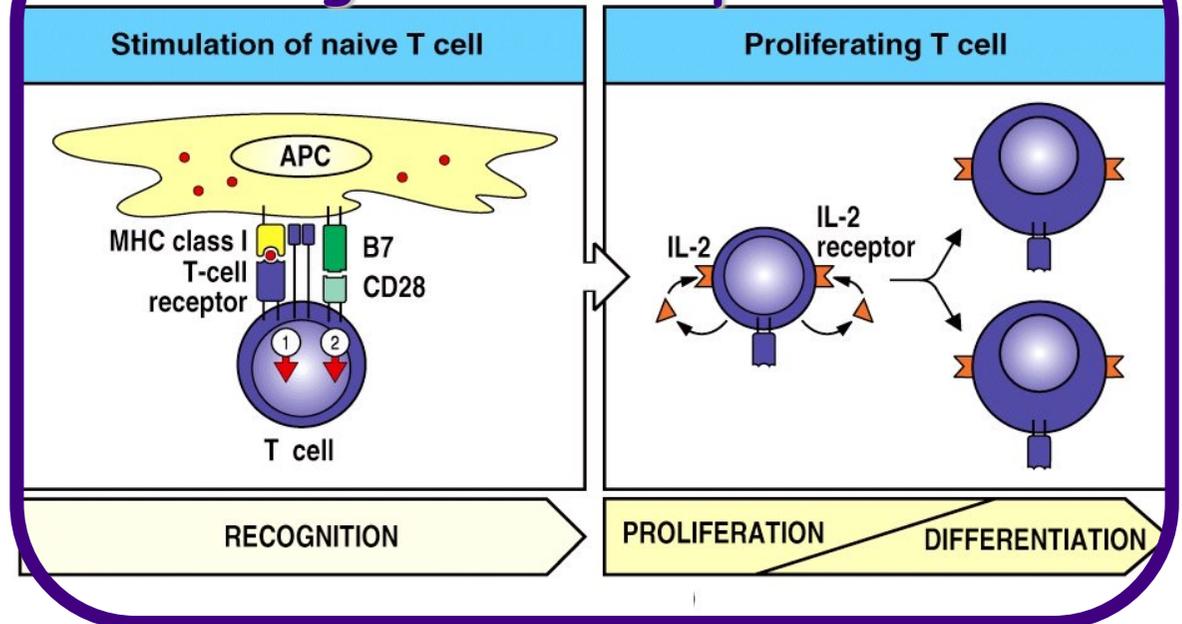


I CD8+ CHE LASCIANO IL TIMO E MIGRANO IN PERIFERIA SONO **PRE-CTL**, IN GRADO DI RICONOSCERE GLI ANTIGENI MA NON DI UCCIDERE LE CELLULE CHE LI ESPRIMONO



Il riconoscimento dell'antigene in presenza di molecole costimolatorie attiva i pre-CTL che differenziano in CTL

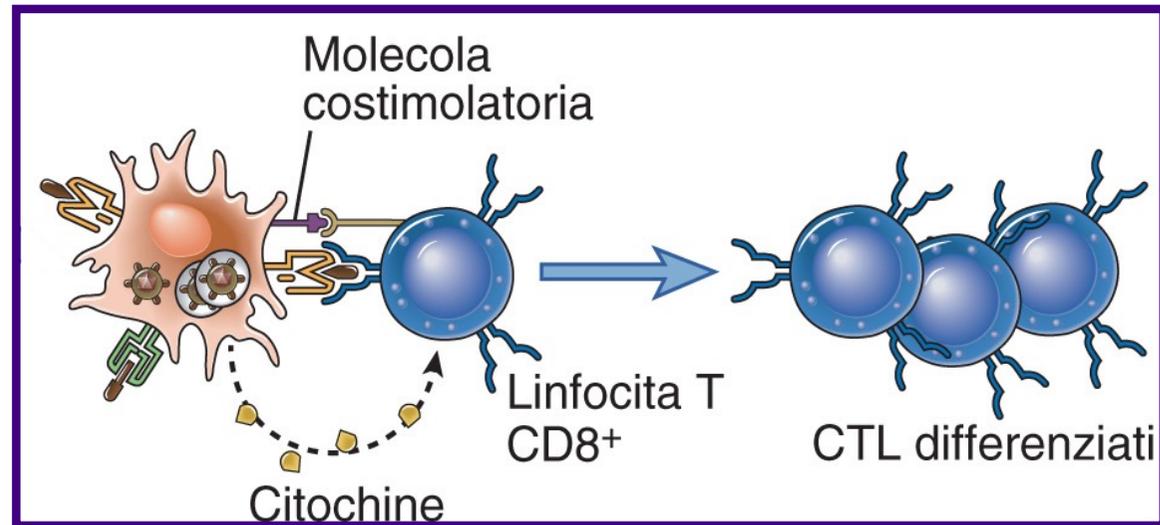
## Organi linfoidi periferici



# Il differenziamento dei CTL è promosso da meccanismi diversi

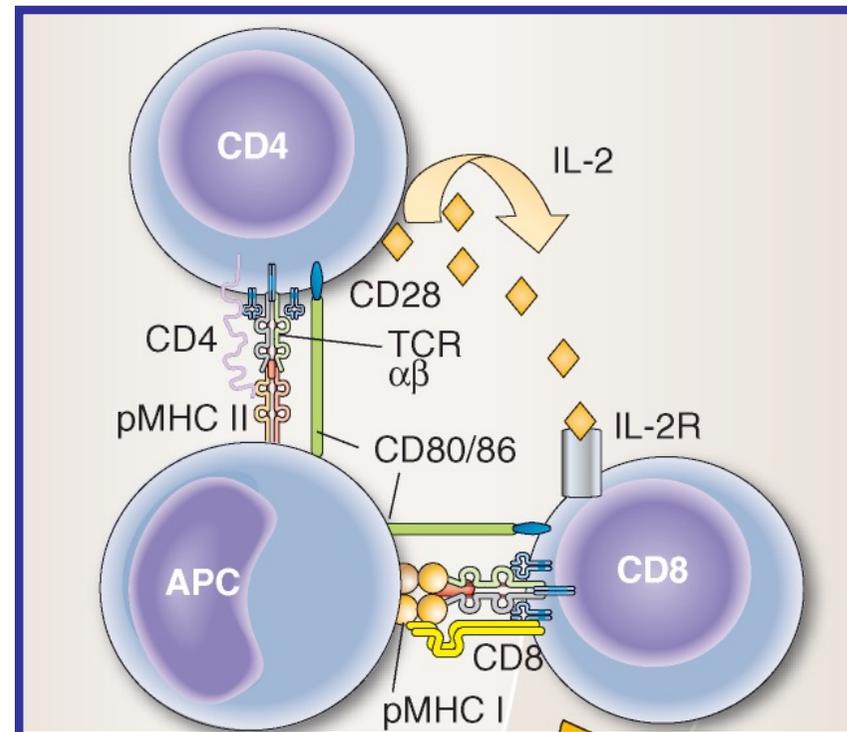
I°

Le DC da sole promuovono il differenziamento in CTL

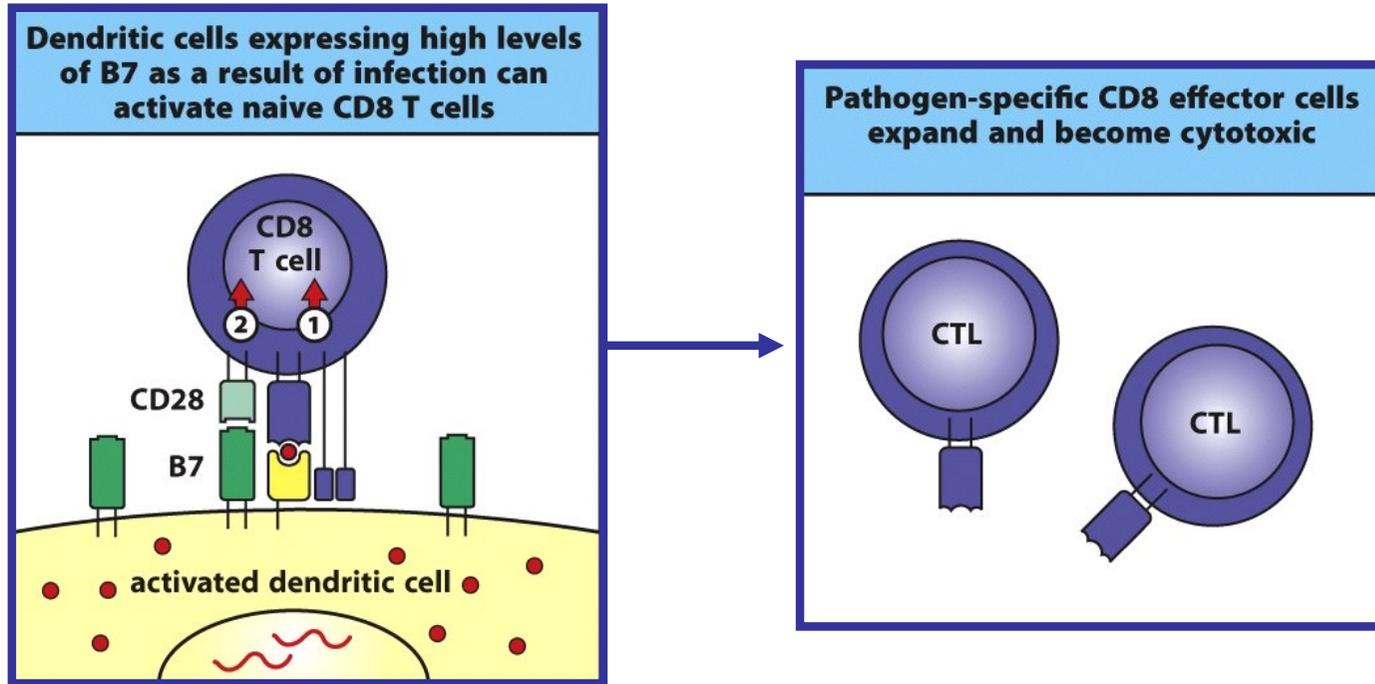


II°

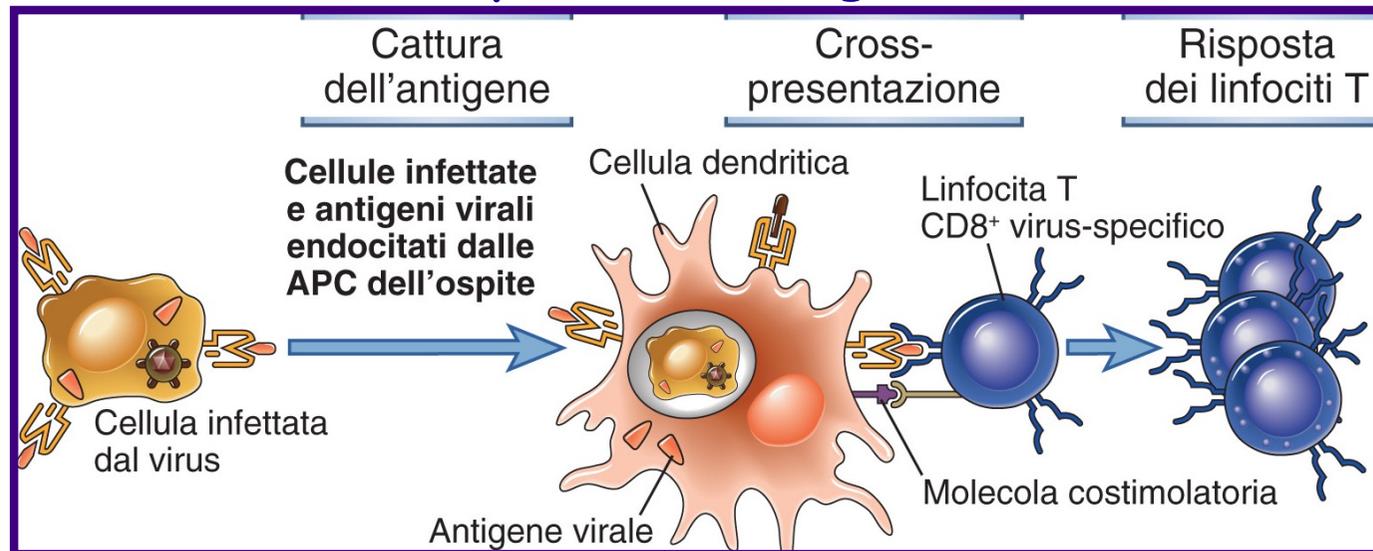
I linfociti T CD4<sup>+</sup> partecipano al differenziamento in CTL



# 1. I linfociti CD8+ "naive" sono attivati da una cellula dendritica infettata da un patogeno intracellulare .....

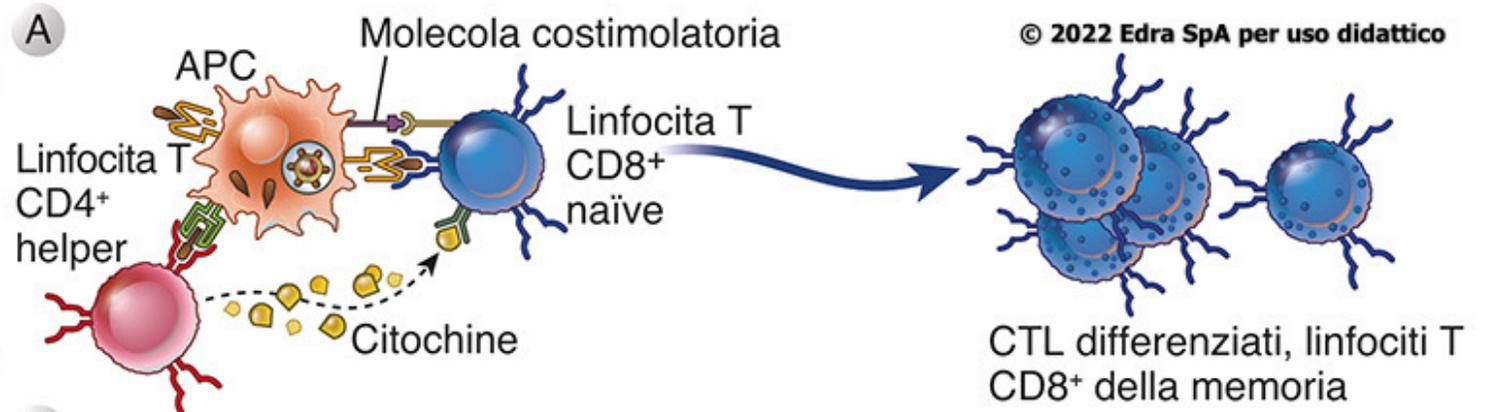


... o da una cellula dendritica non infettata che cross-presenta antigeni virali

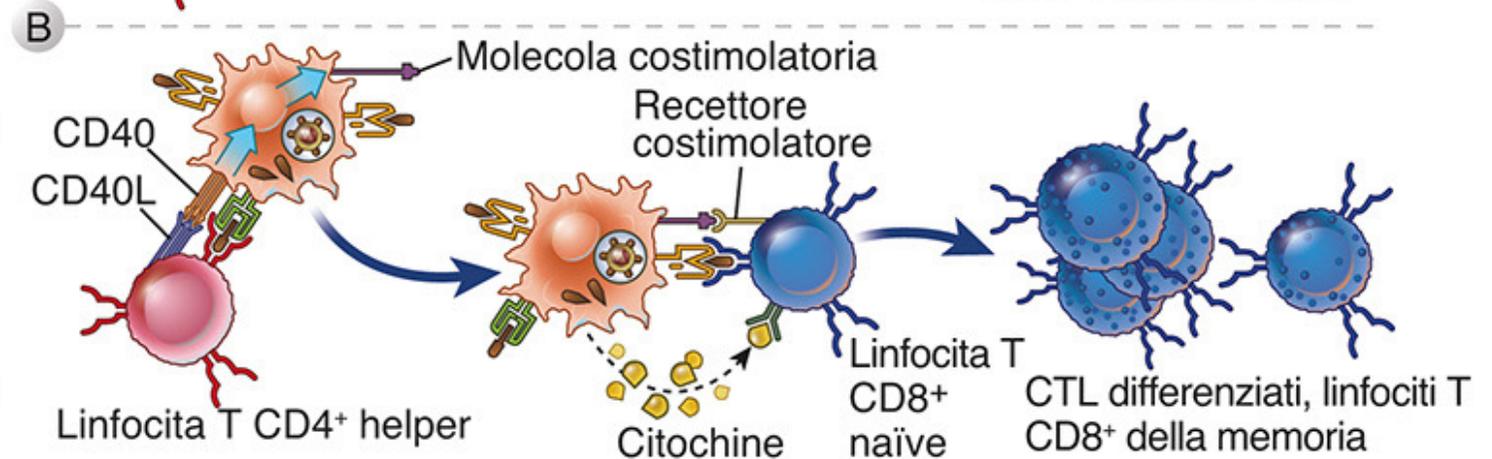


## 2. I linfociti T CD4+ possono contribuire all'attivazione dei linfociti T CD8+

I linfociti T CD4+ helper producono citochine che stimolano la differenziazione dei CTL



I linfociti T CD4+ helper aumentano la capacità delle APC di stimolare la differenziazione dei CTL



# MECCANISMI DI ATTIVAZIONE DEI pre-CTL

1. I linfociti CD8<sup>+</sup> naive sono stimolati da una cellula dendritica

La cellula dendritica è infettata

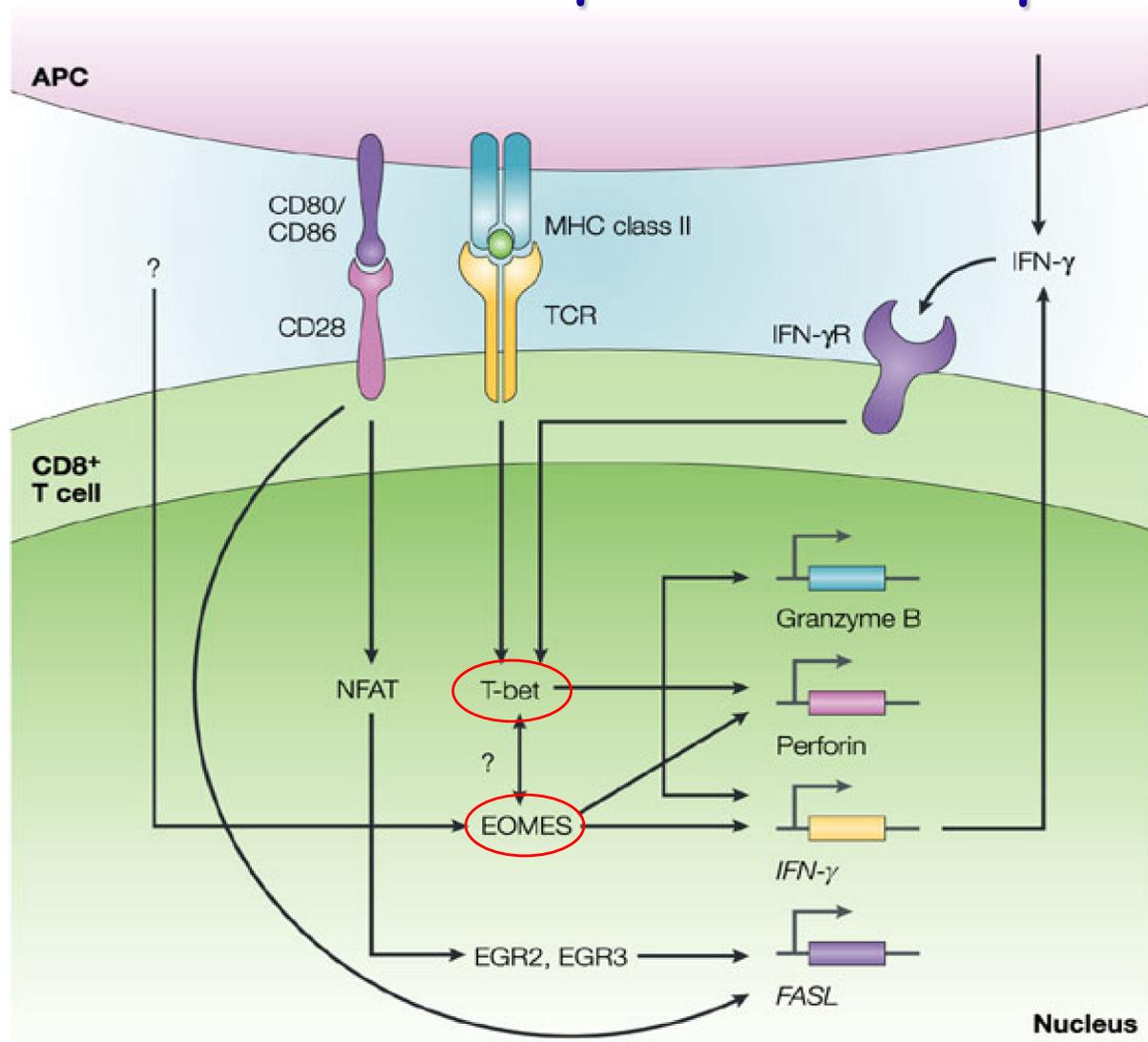
Fagocitosi di una cellula apoptotica infettata e cross-presentazione

2. I linfociti T CD4<sup>+</sup> contribuiscono all'attivazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup>

Fornendo IL-2

Potenziando le funzioni delle APC

# Durante il differenziamento da pre-CTL a CTL si forma il macchinario litico: i CTL acquisiscono la capacità di uccidere



Viene indotta la sintesi di:

- Mediatori litici
- Citochine (IFN $\gamma$  e TNF $\beta$ )
- Ligandi di recettori di morte (FasL)

**EOMES = Eomesodermin**

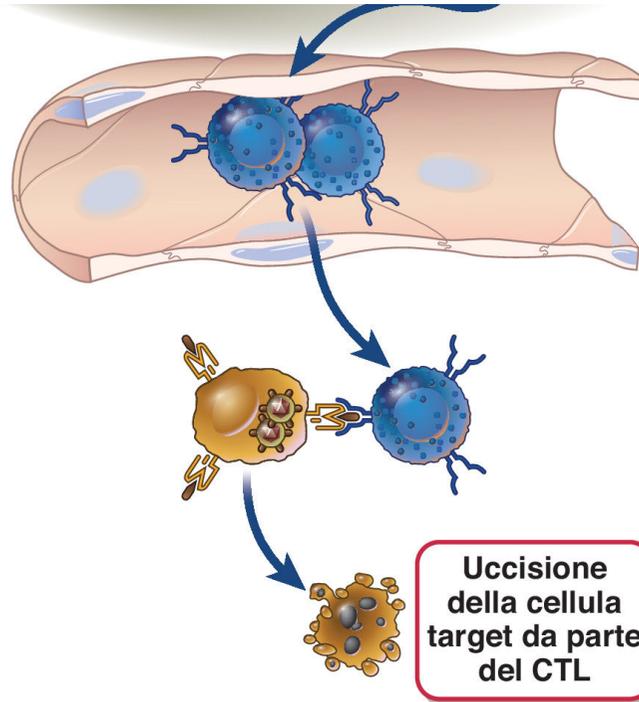
**EGR2 = early growth response 2**

# I CTL migrano nel sito di infezione ...

I linfociti CTL CD8<sup>+</sup>  
differenziati  
entrano in circolo

Migrazione  
dei linfociti T  
effettori e di altri  
leucociti ai siti  
dell'antigene

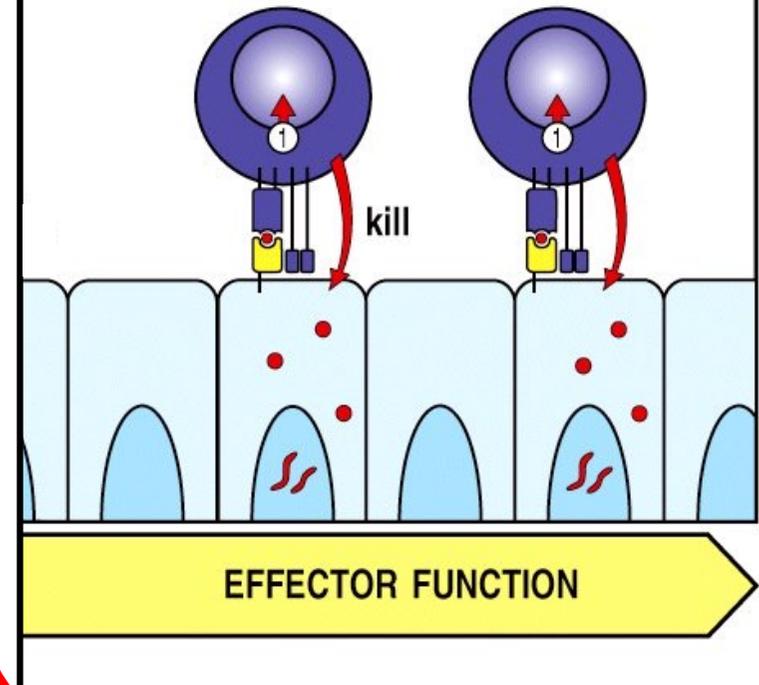
Funzioni effettrici  
dei linfociti T



....dove vengono attivati dal  
riconoscimento dell'antigene e  
uccidono la cellula infettata!

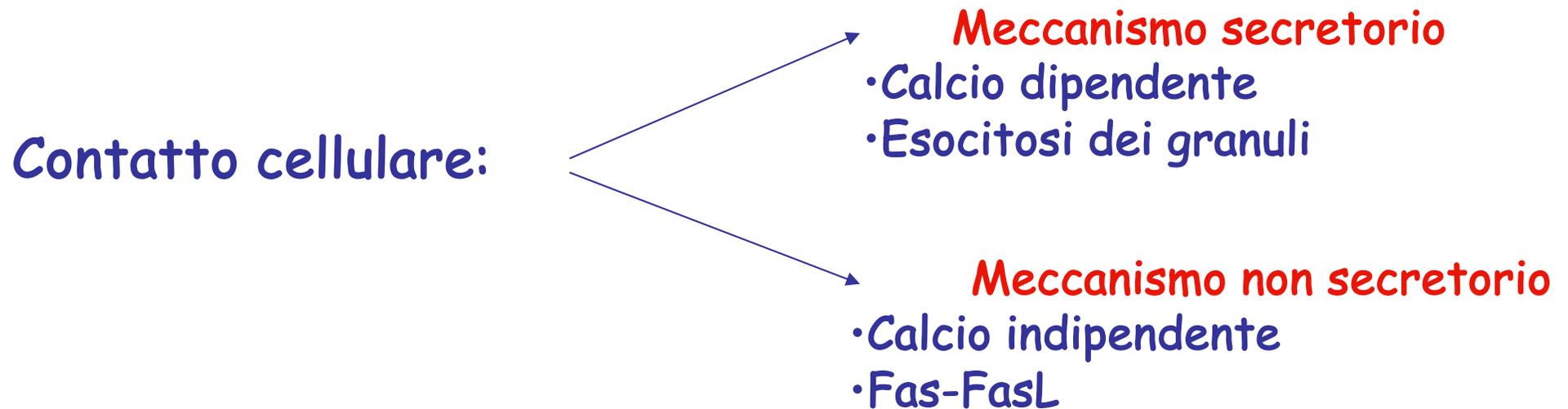
## Sito di infezione

Active effector T cells kill  
virus-infected target cells



# MECCANISMI DI LISI MEDIATA DAI CTL

## CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA:

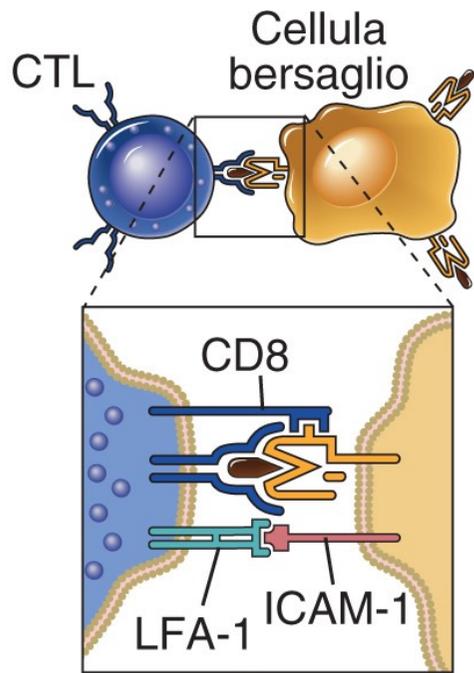


Secrezione di citochine:  $IFN\gamma$   $TNF\ \alpha/\beta$

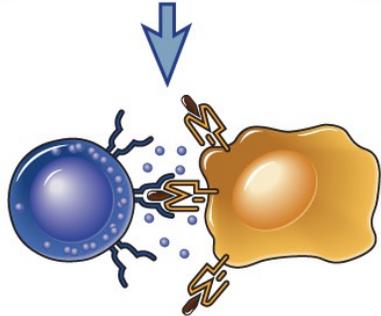
## MORTE DELLA CELLULA BERSAGLIO

- Lisi osmotica
- Apoptosi

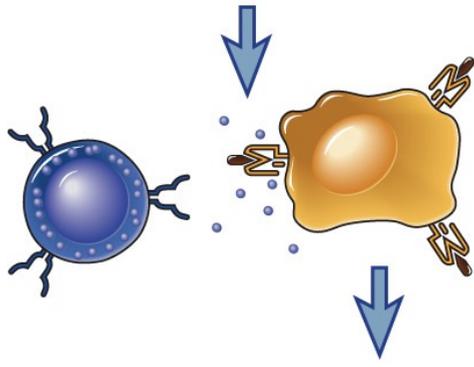
# CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA CONTATTO CELLULARE: MECCANISMO SECRETORIO



Riconoscimento  
dell'antigene  
e formazione  
della sinapsi  
immunologica



Esocitosi  
dei granuli



Distacco  
del CTL



Morte della  
cellula bersaglio

Cytotoxic  
T-Lymphocyte  
Killing Target

© James A. Sullivan  
Quill Graphics  
Charlottesville, VA USA

# Le interazioni fra CTL e cellule bersaglio sono inizialmente mediate dalle molecole di adesione

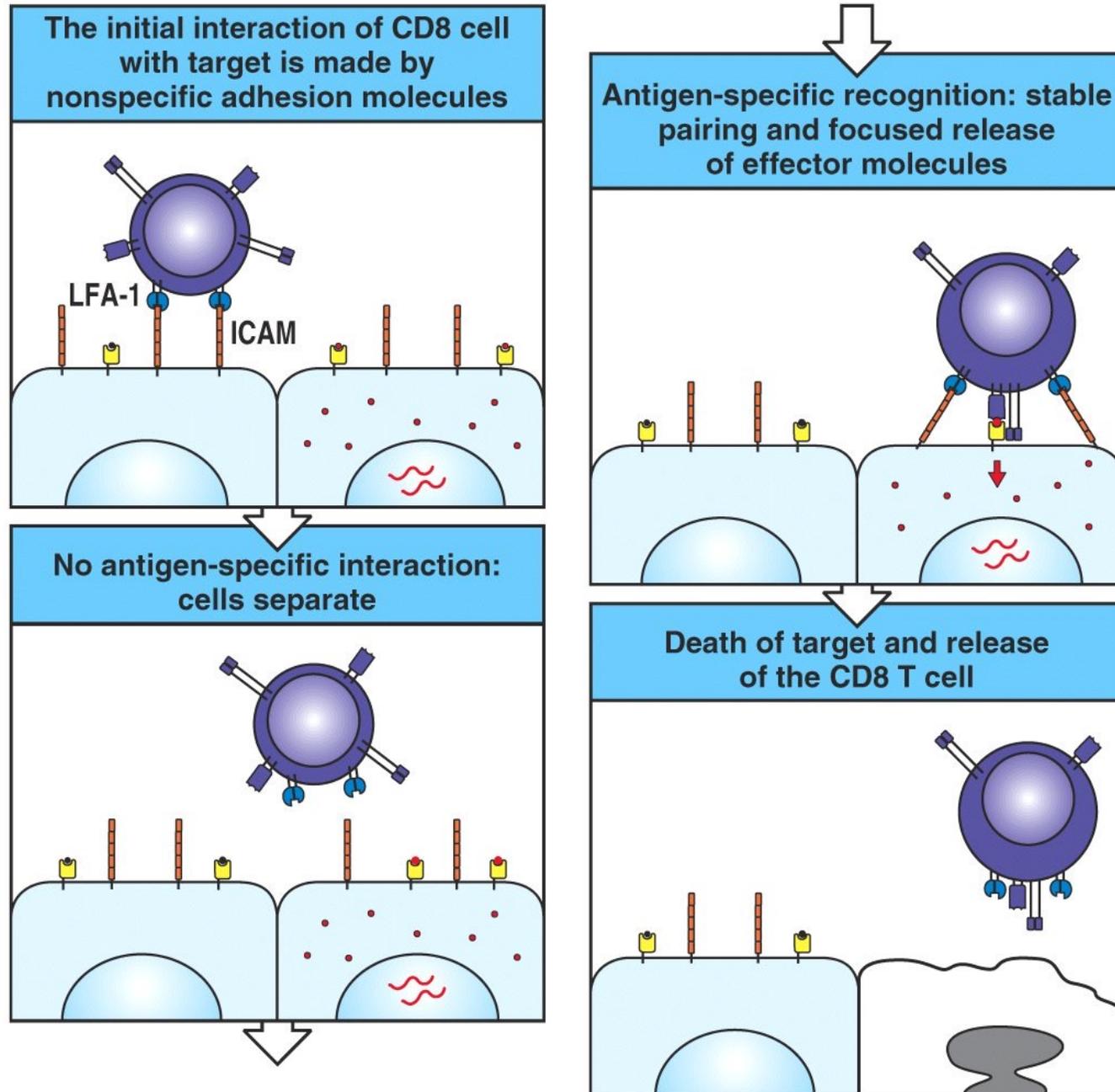
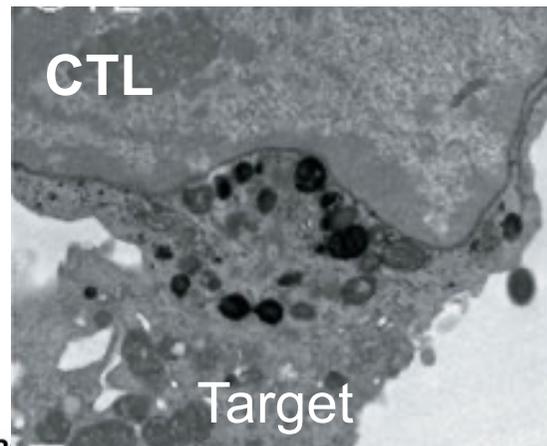
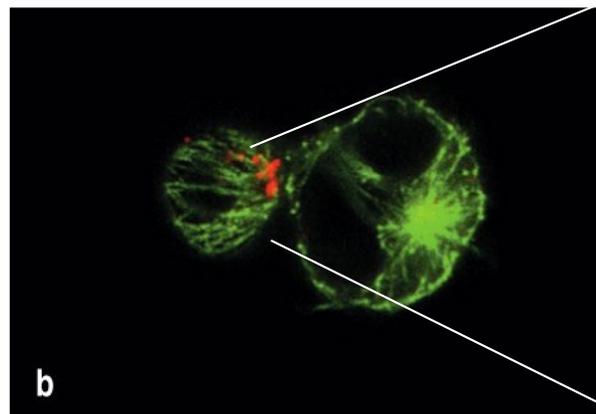
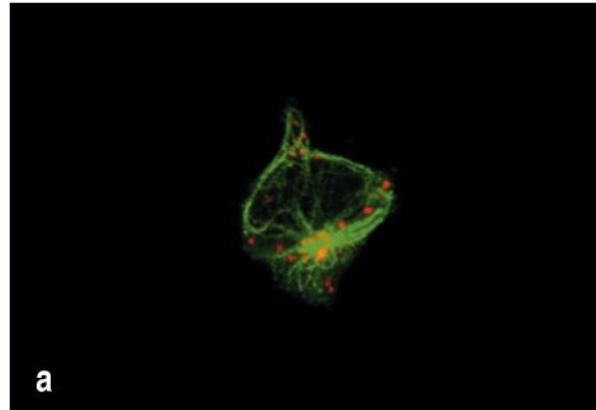
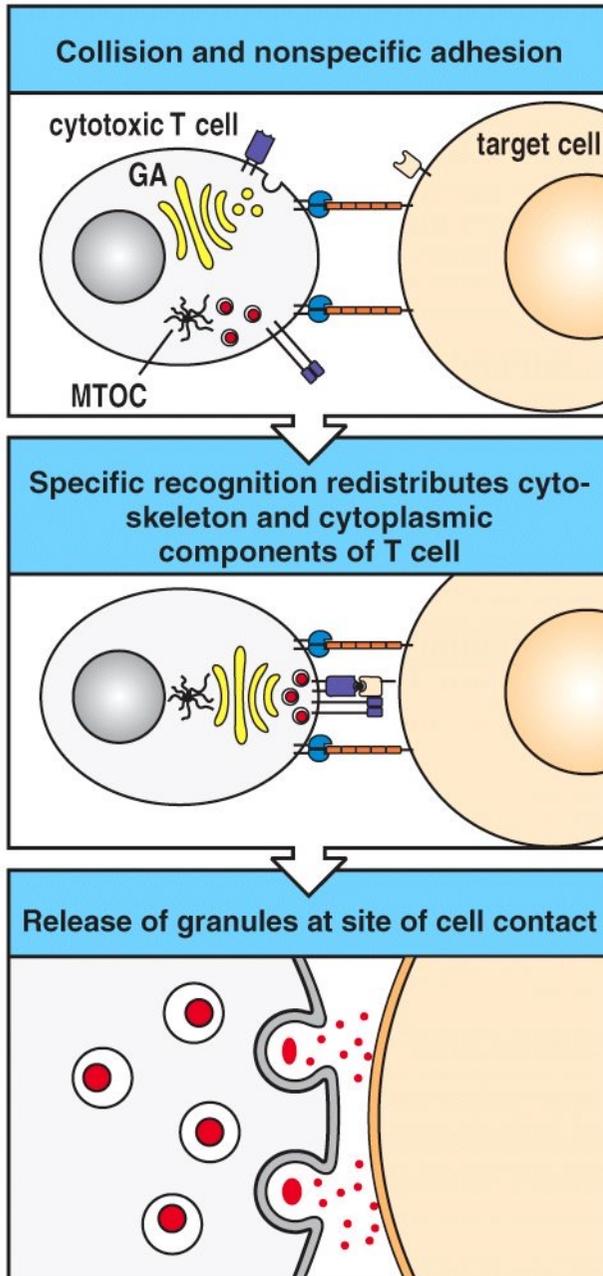


Figure 8-28 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Riconoscimento specifico, polarizzazione dei granuli citotossici e rilascio dei mediatori litici



MTOC = centro di organizzazione dei microtubuli

## La sinapsi citotossica

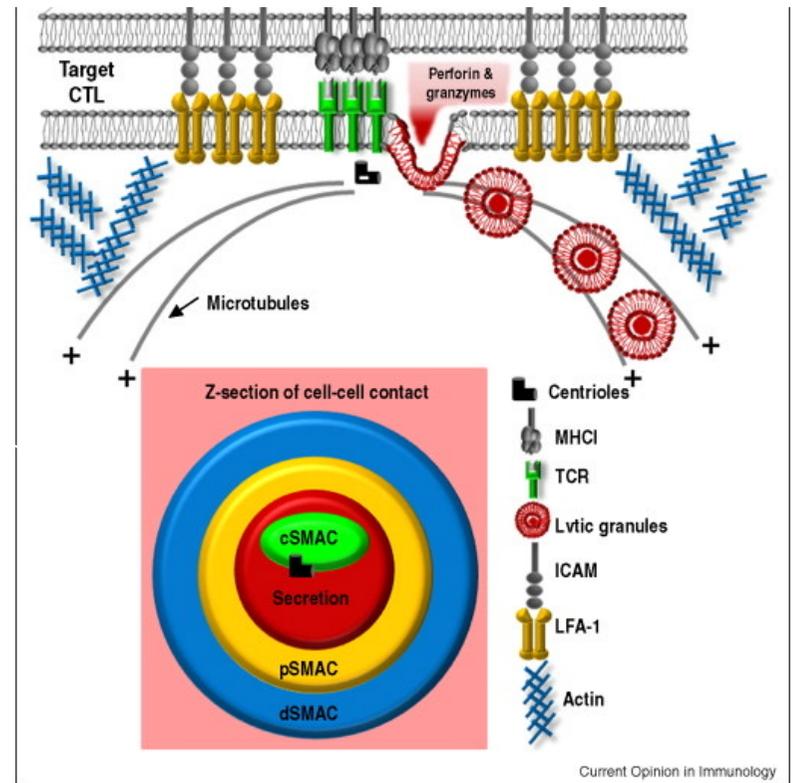
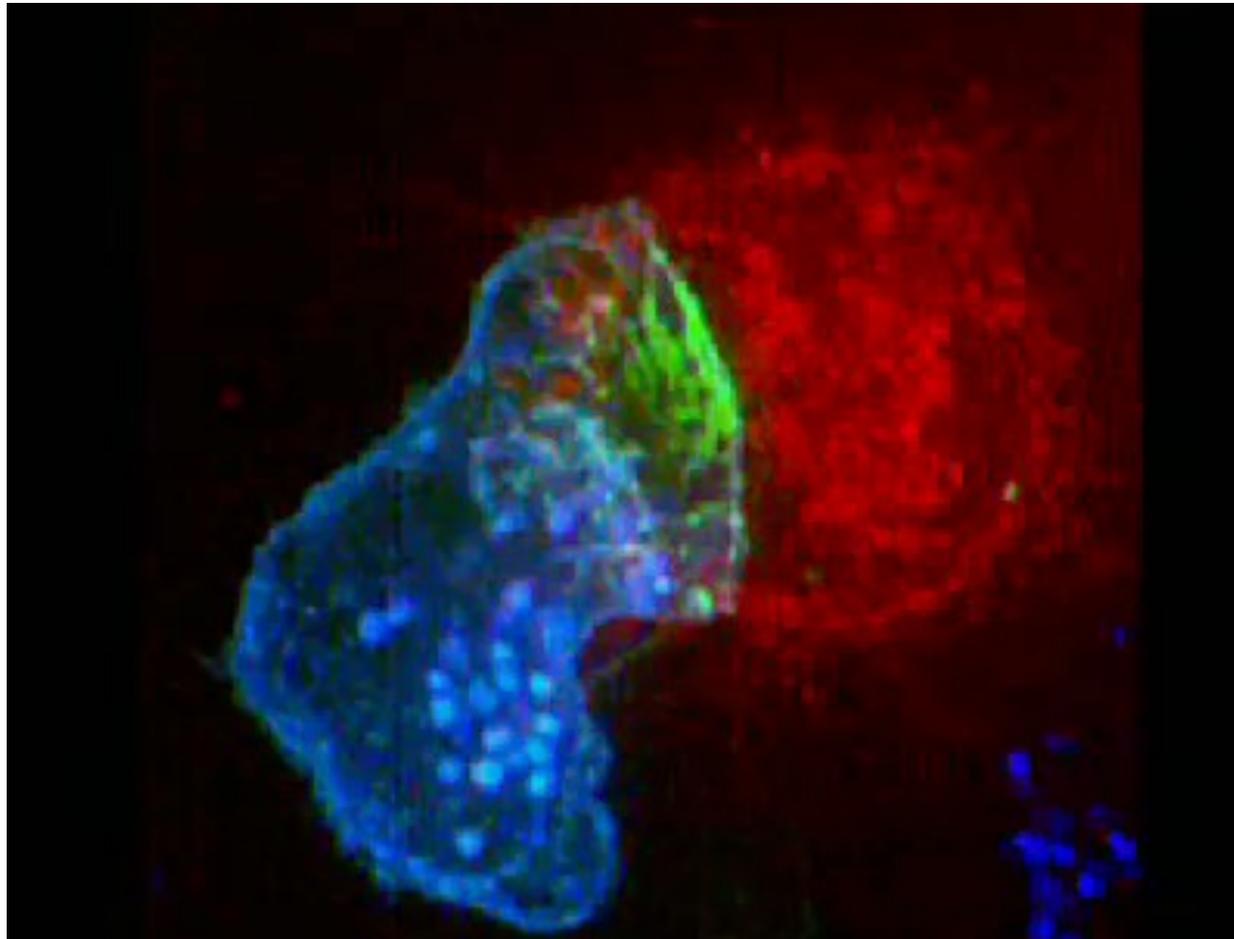
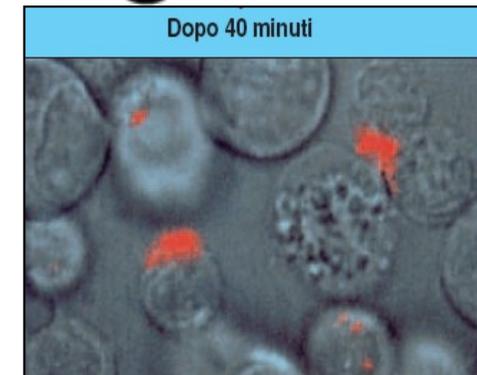
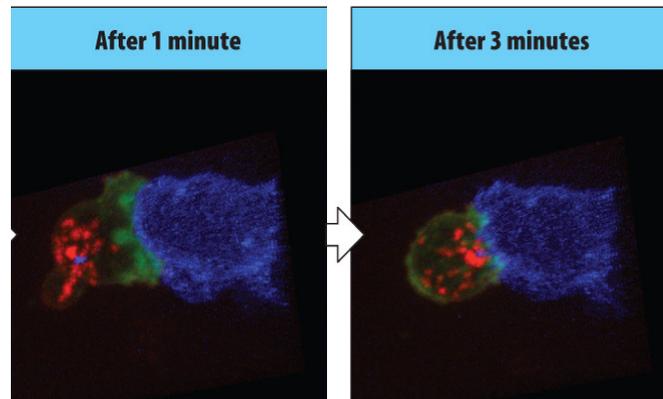
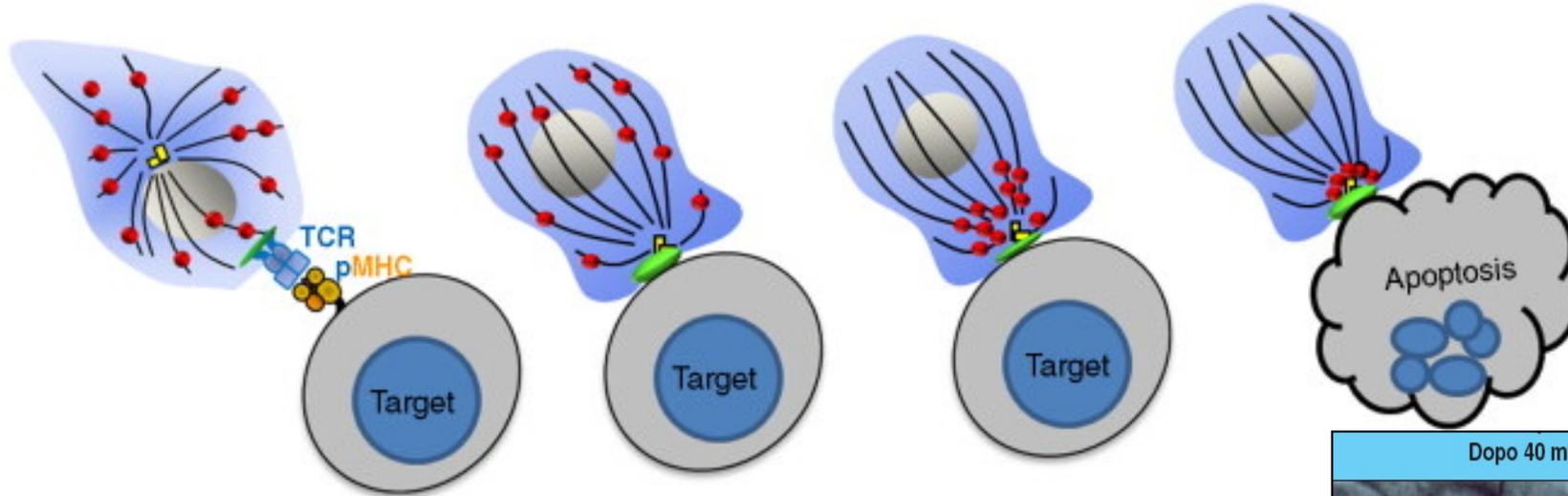
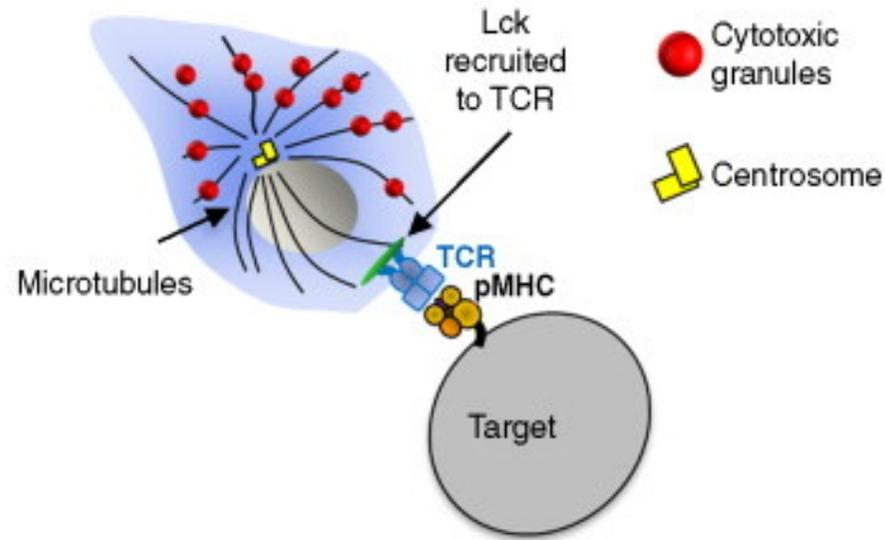


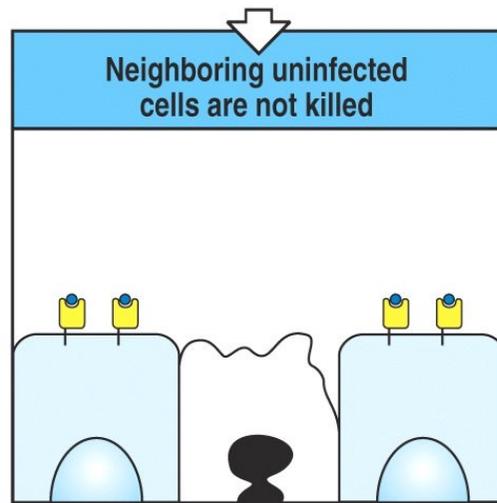
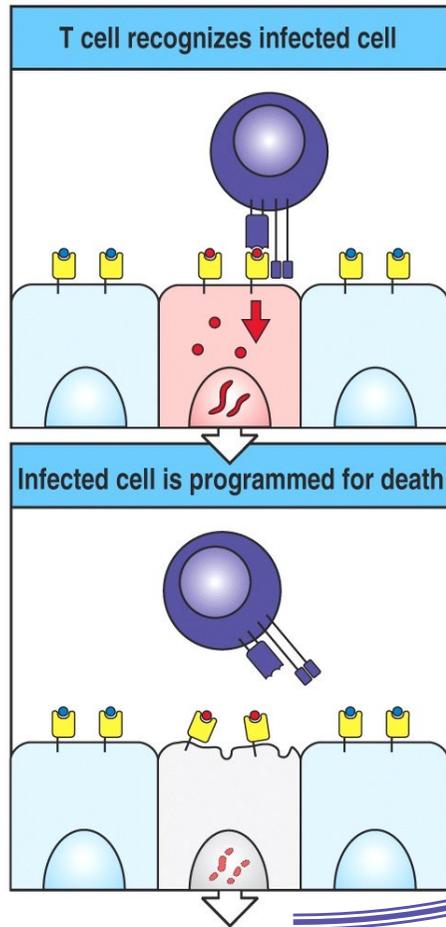
Figure 8-29 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2007

# La sinapsi citotossica



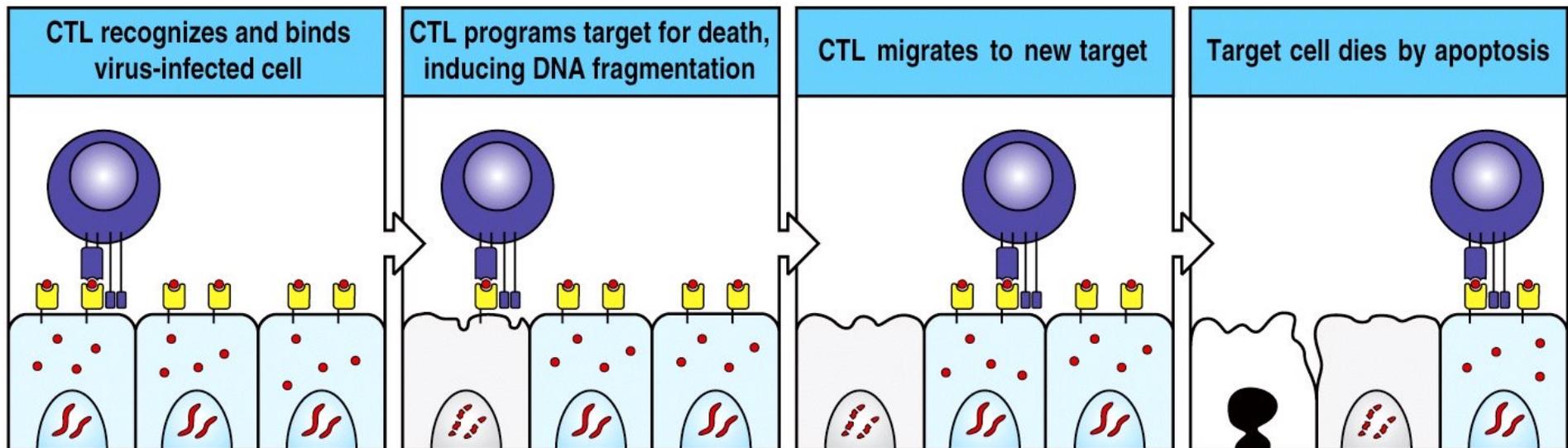
# I granuli sono secreti in modo POLARIZZATO





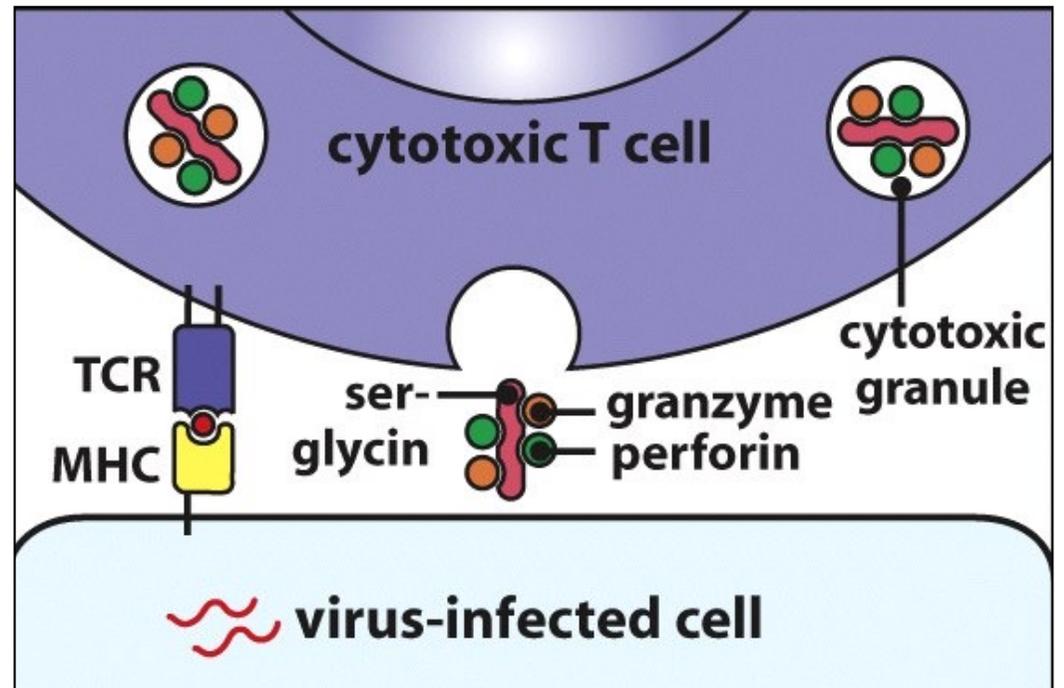
I CTL uccidono in maniera selettiva....

....e seriale

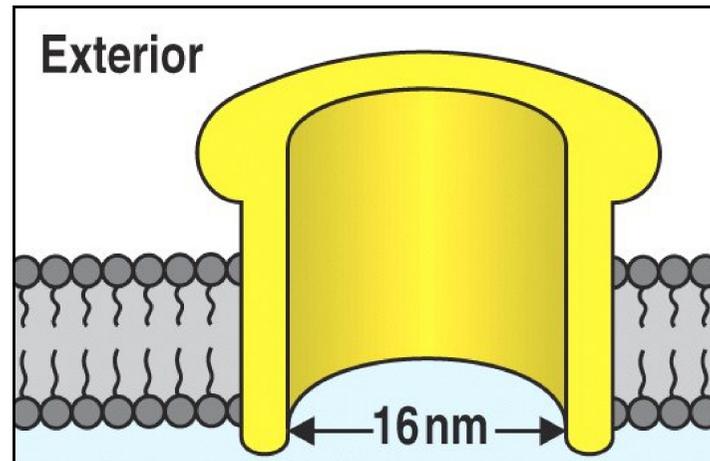
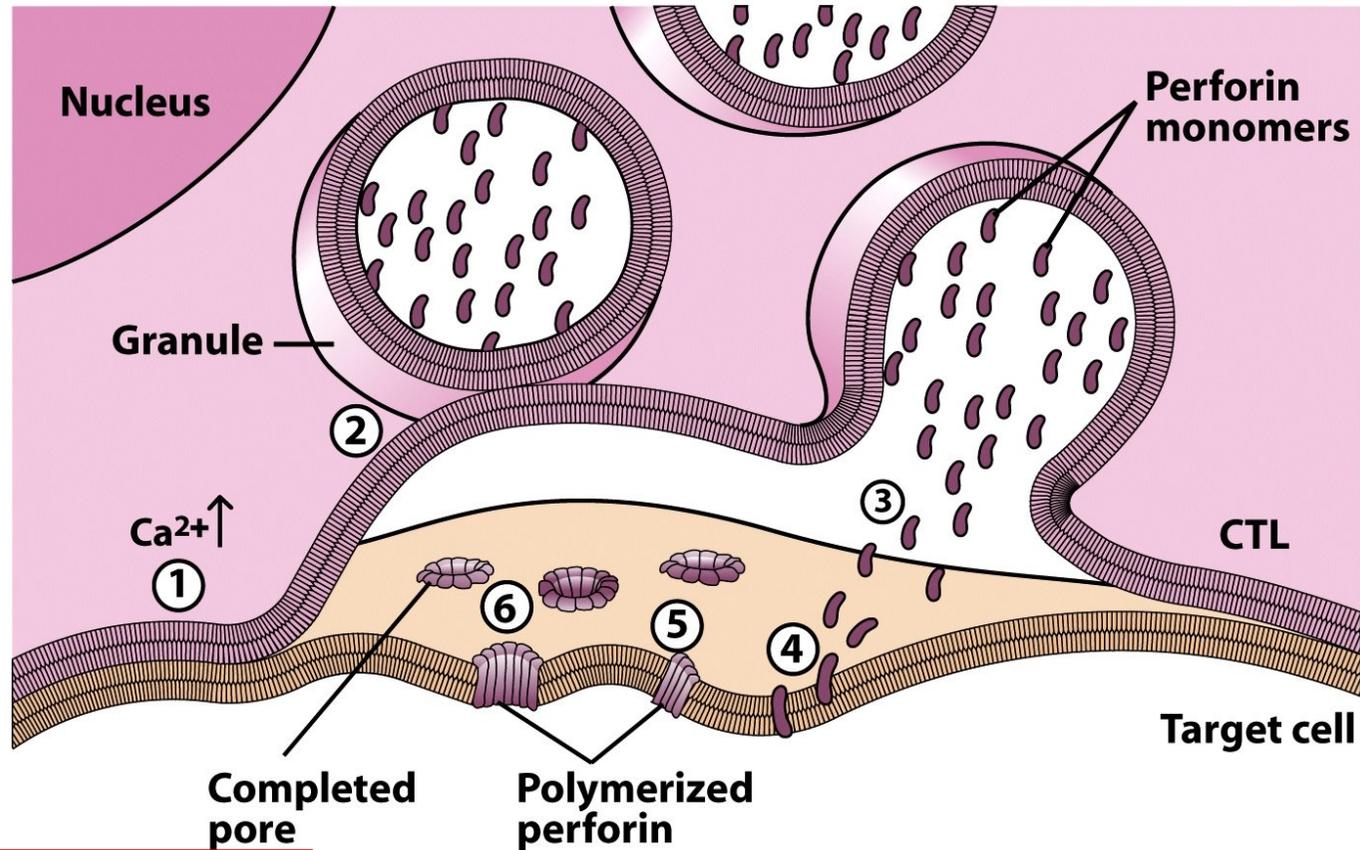


# Cosa contengono i granuli citotossici?

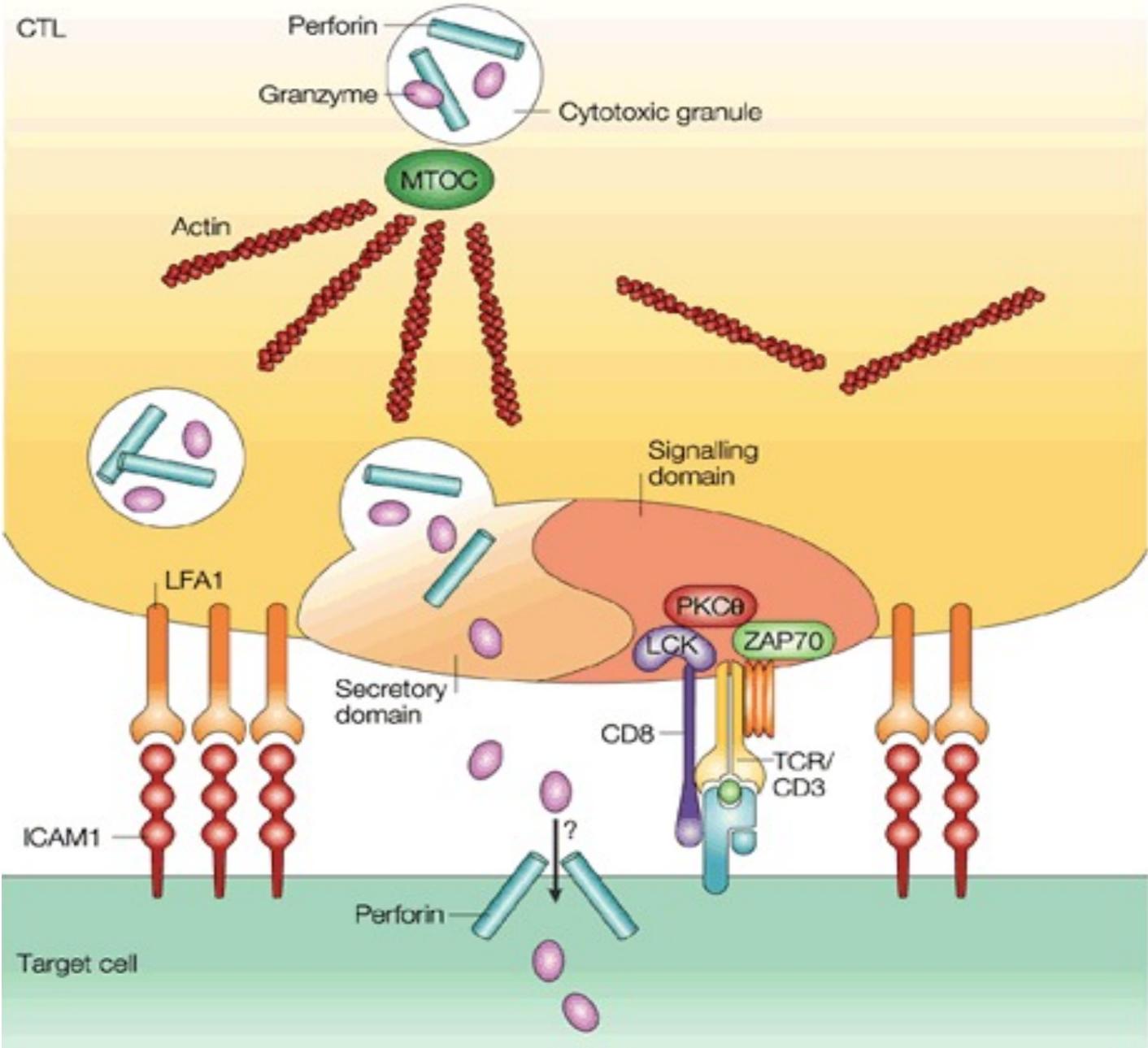
Protein in granules of cytotoxic T cells	Actions on target cells
Perforin	Aids in delivering contents of granules into the cytoplasm of target cell
Granzymes	Serine proteases, which activate apoptosis once in the cytoplasm of the target cell
Granulysin	Has antimicrobial actions and can induce apoptosis



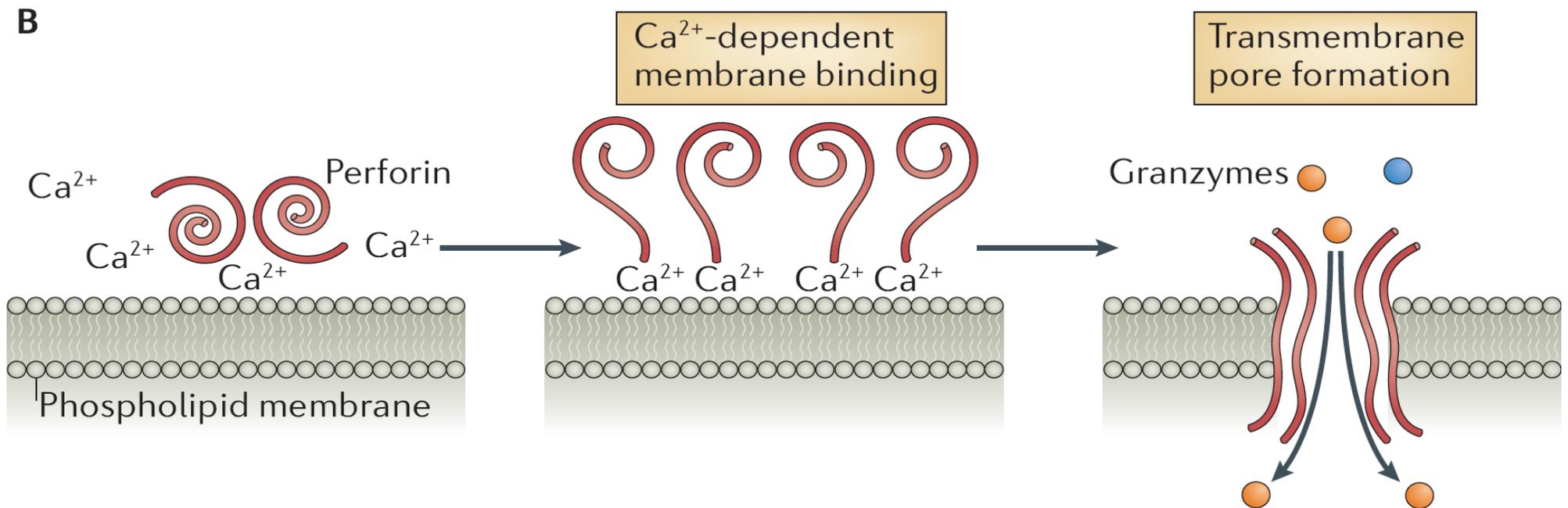
# La polimerizzazione della perforina crea dei pori sulla membrana della cellula bersaglio



# La perforina polimerizza al centro della sinapsi secretoria



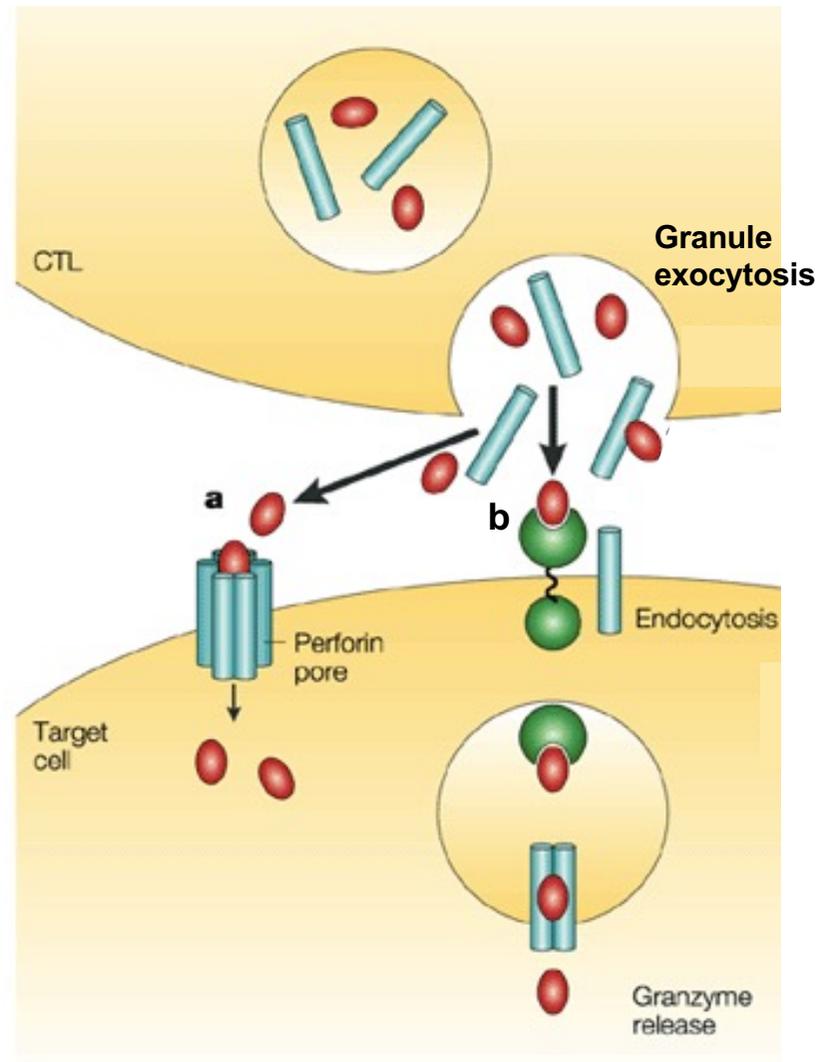
# Model of perforin and granzyme synergy in target-cell death



Perforin polymerizes into transmembrane pores (Ca<sup>++</sup>- and pH-dependent), through which granzymes might diffuse into the cell

# Modelli di ingresso dei Granzimi nella cellula bersaglio

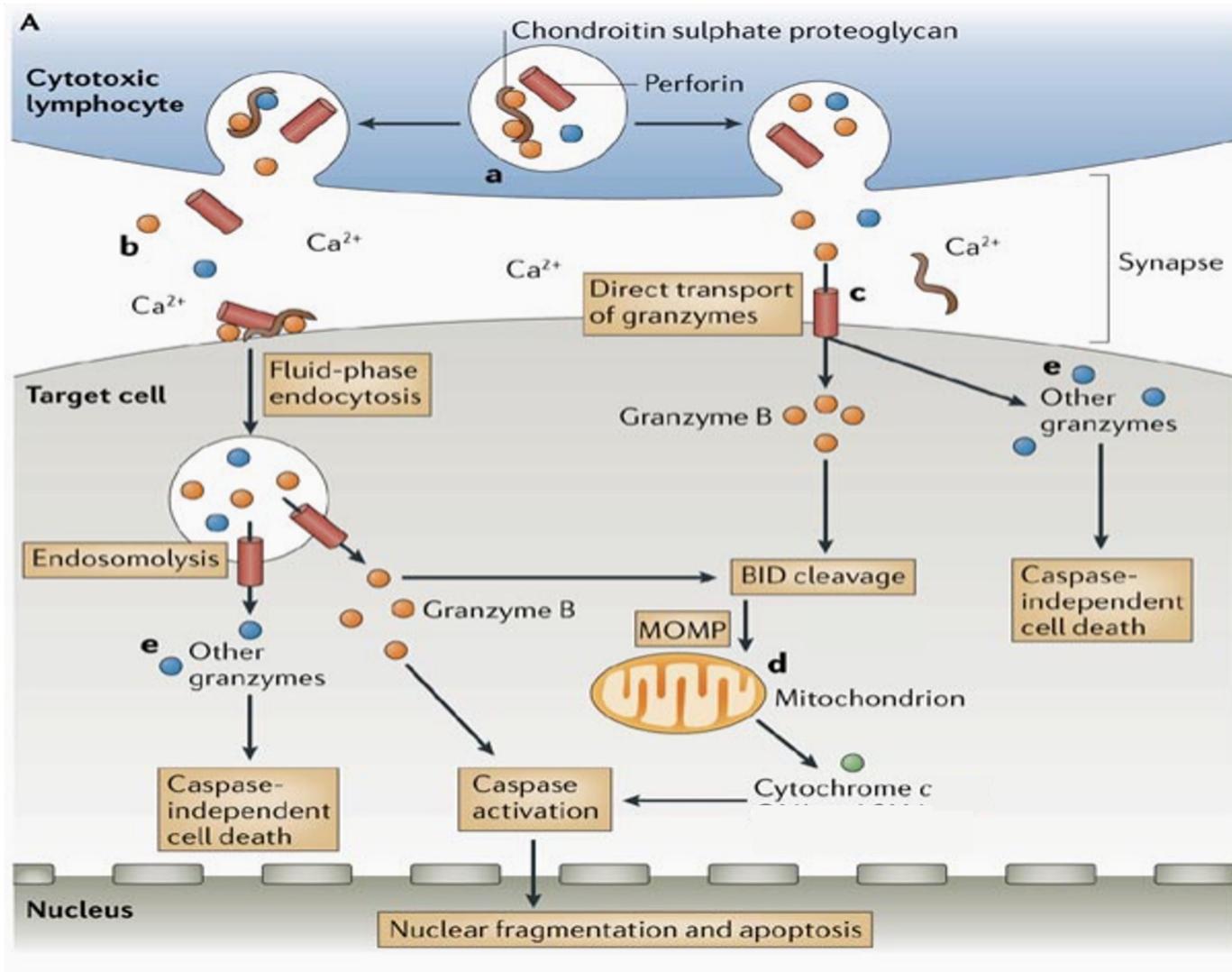
La perforina consente la diffusione dei granzimi nel citoplasma della cellula bersaglio creando dei pori sulla sua membrana plasmatica



I granzimi vengono riconosciuti da recettori specifici e internalizzati insieme alla perforina.

All'interno degli endosomi la perforina consente la fuoriuscita dei granzimi nel citosol

# Perforina e granzimi cooperano nell'indurre la morte del bersaglio

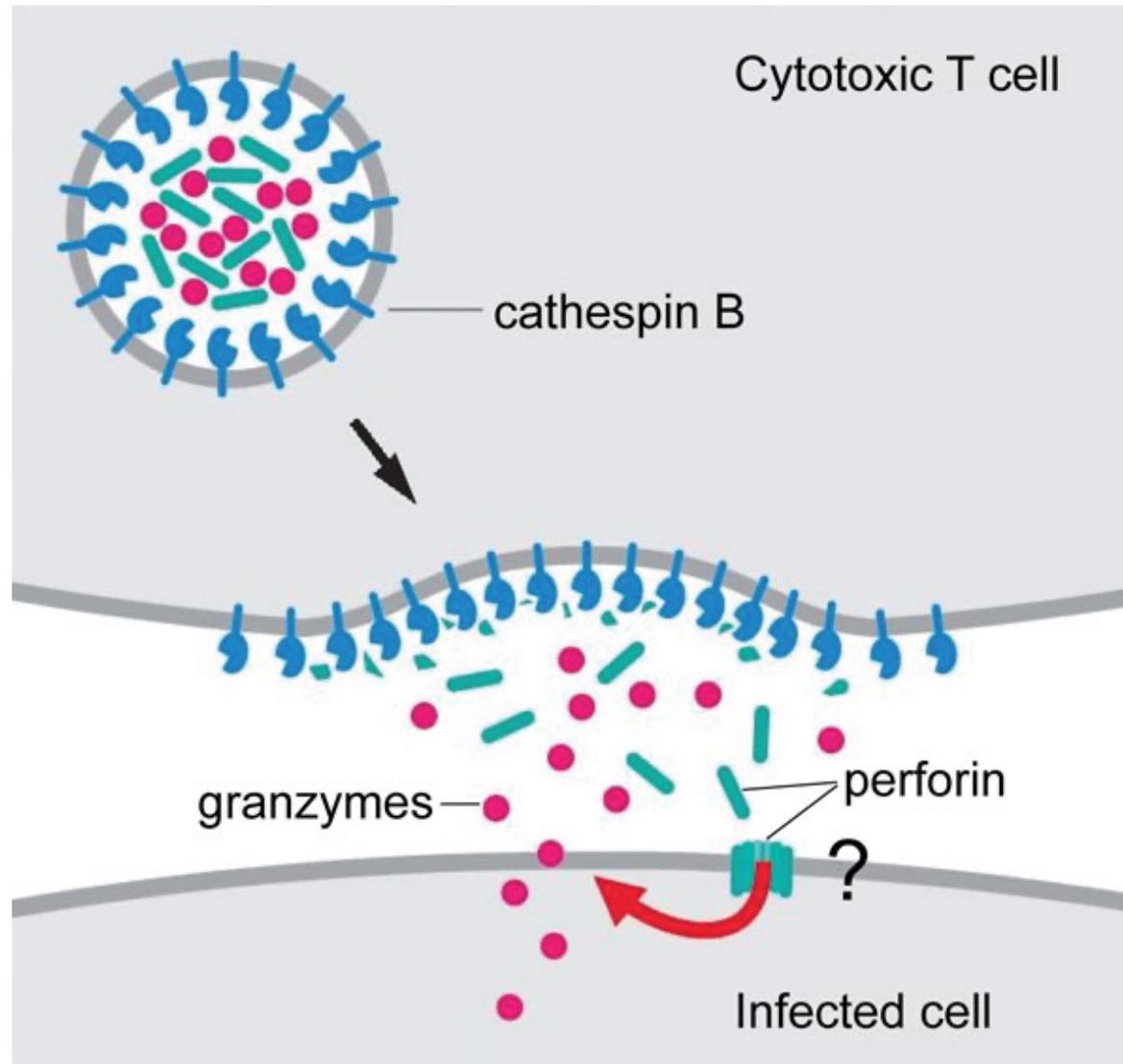


**Perforina** induce i pori!!

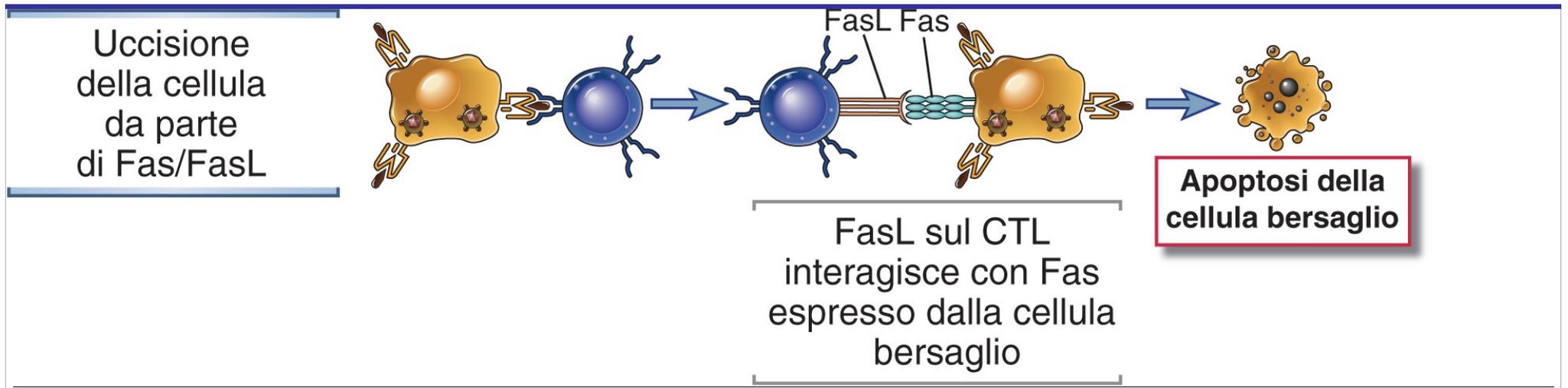
**Granzyme B** attiva le caspasi e induce morte apoptotica!!

**Granzyme A** distrugge un complesso nucleare e libera una endonucleasi che taglia il DNA e induce morte apoptotica!!

# Perché il CTL non viene ucciso?



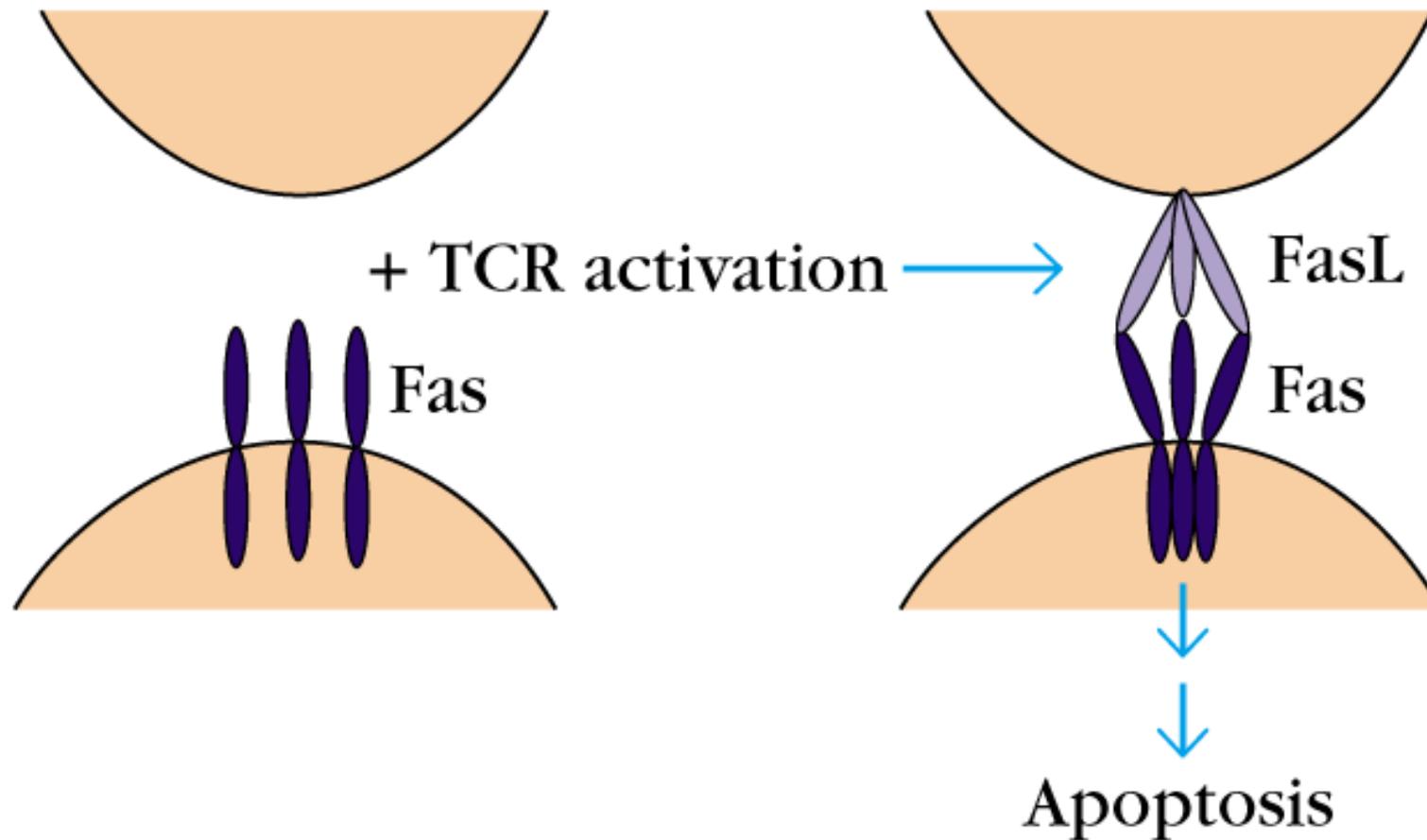
# CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA CONTATTO CELLULARE: **MECCANISMO NON SECRETORIO**



# FAS/FASL interaction triggers apoptosis

## FAS ligand (FASL):

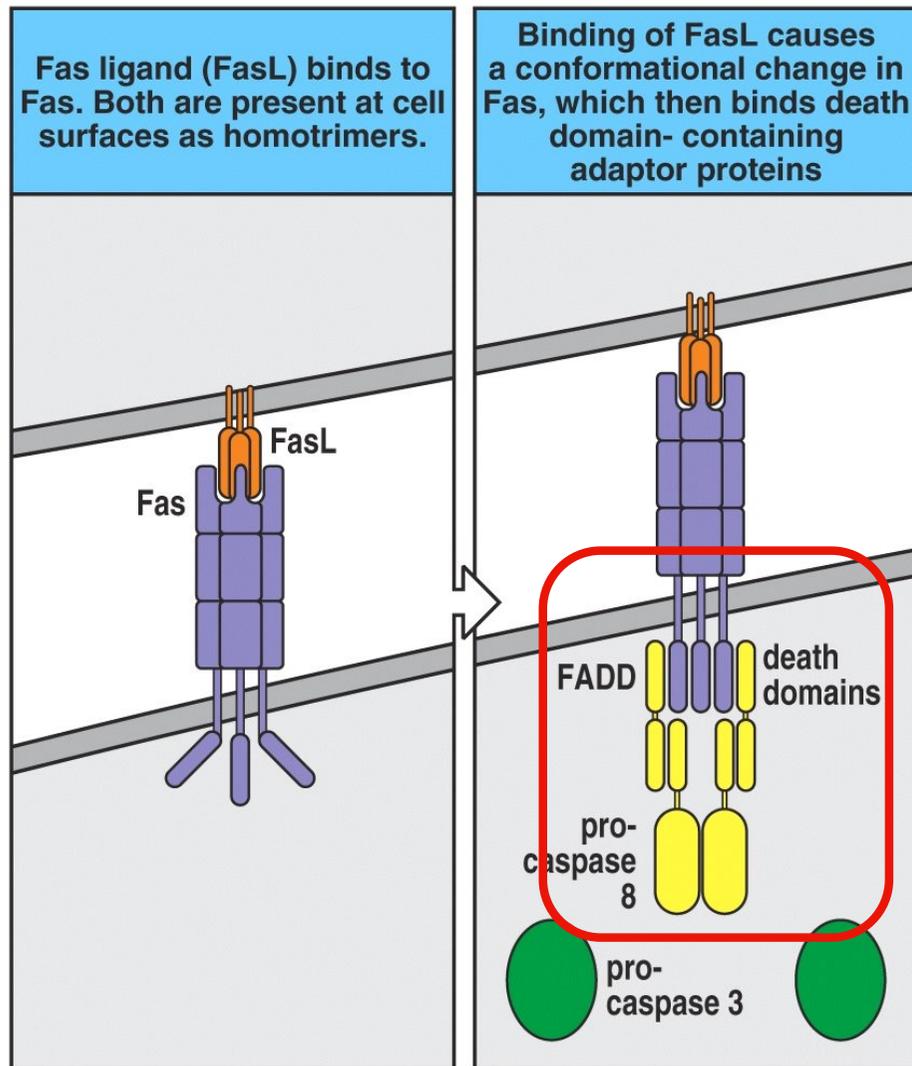
- a type II transmembrane protein, expressed on activated T (CD8, Th1) and NK cells
- induced by activation (antigen recognition), and rapidly shed from cell surface (function of soluble form?)



## FAS:

a transmembrane protein, widely expressed;  
also expressed on hematopoietic cells after activation

# FAS/FASL interaction triggers apoptosis



Fas è un recettore di morte:  
l'interazione con il suo ligando (FasL)  
induce morte per apoptosi

FAS trimerico  
FADD  
Caspasi 8

Figure 6-24 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

FADD= Fas-associated death domain (proteina adattatrice)

# L'interazione tra Fas ed il suo ligando attiva una cascata di caspasi

1. Caspasi 8 → 2. Caspasi 3

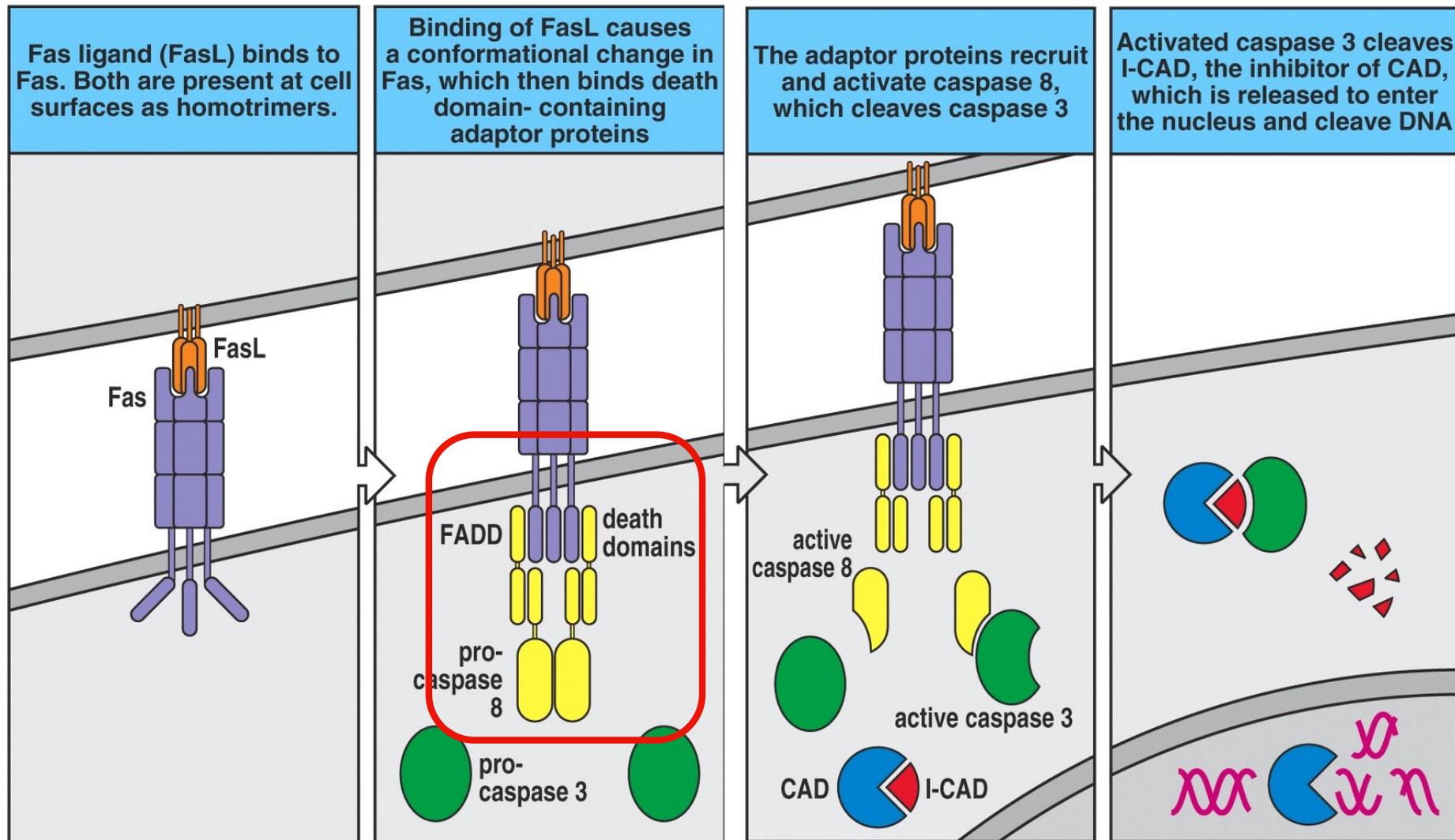


Figure 6-24 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figure 6-24 part 2 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

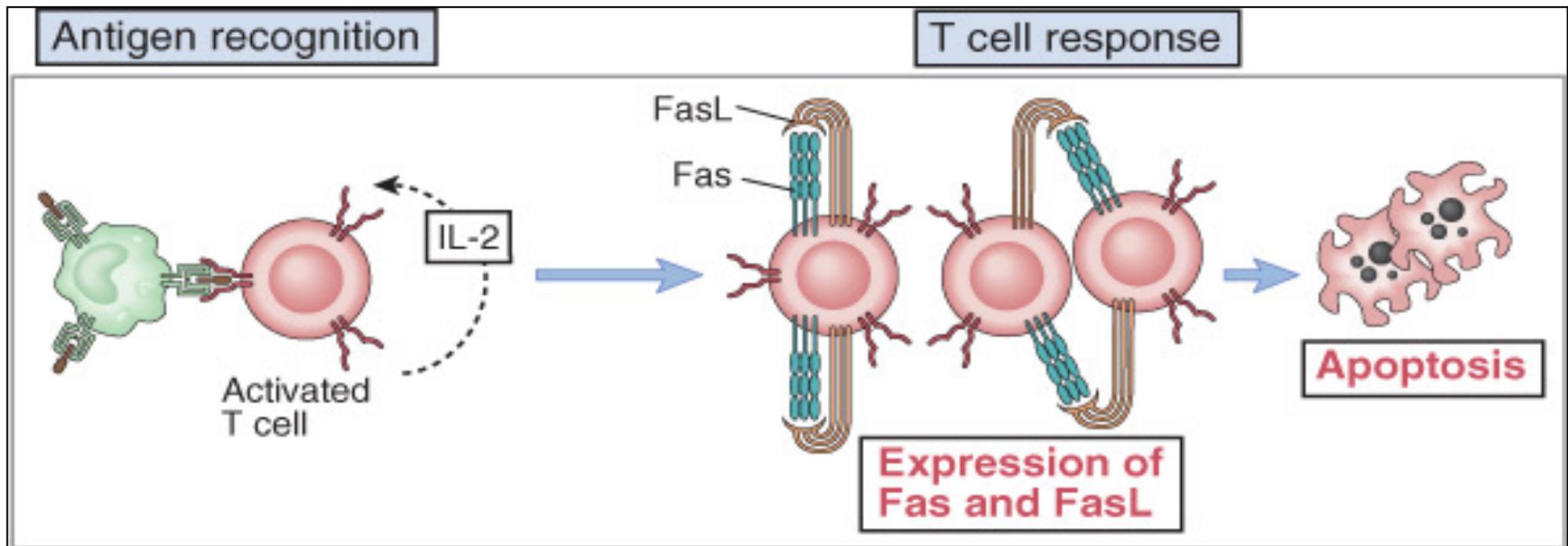
(CAD= caspase activable DNase)

## CITOTOSSICITA' MEDIATA DA FAS:

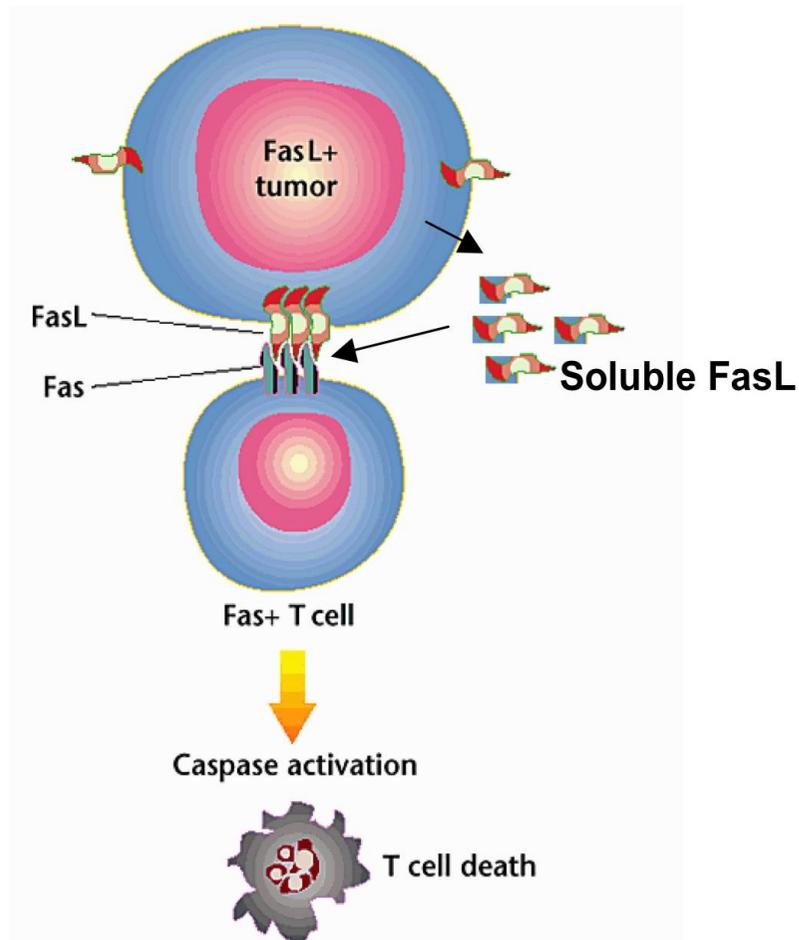
- Meccanismo di regolazione delle risposte immunitarie
- Meccanismo utilizzato dai tumori per evadere la sorveglianza immunologica
- Meccanismo di difesa degli organi immunologicamente privilegiati

# SEGNALI NEGATIVI CHE REGOLANO L' ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T

Apoptosi indotta dall'attivazione



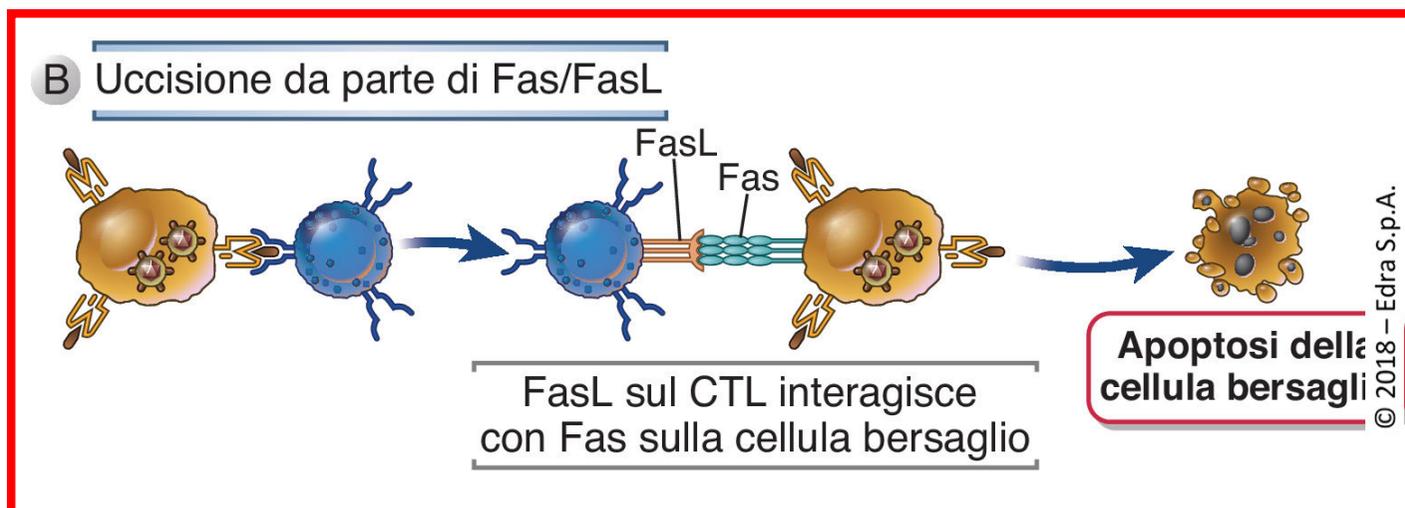
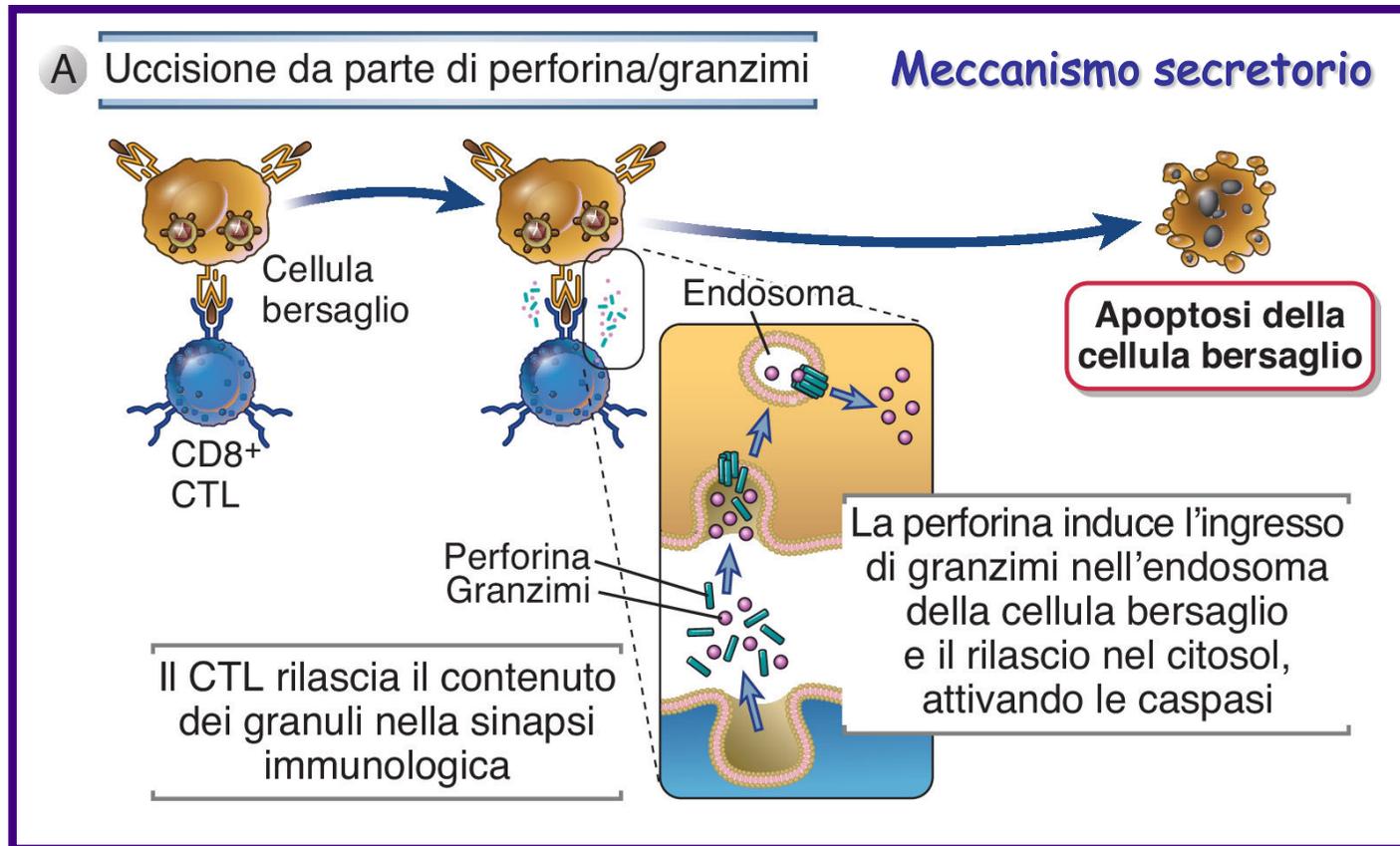
Alcuni tumori evadono la risposta immunitaria in quanto perdono l'espressione di Fas ed esprimono il ligando di Fas



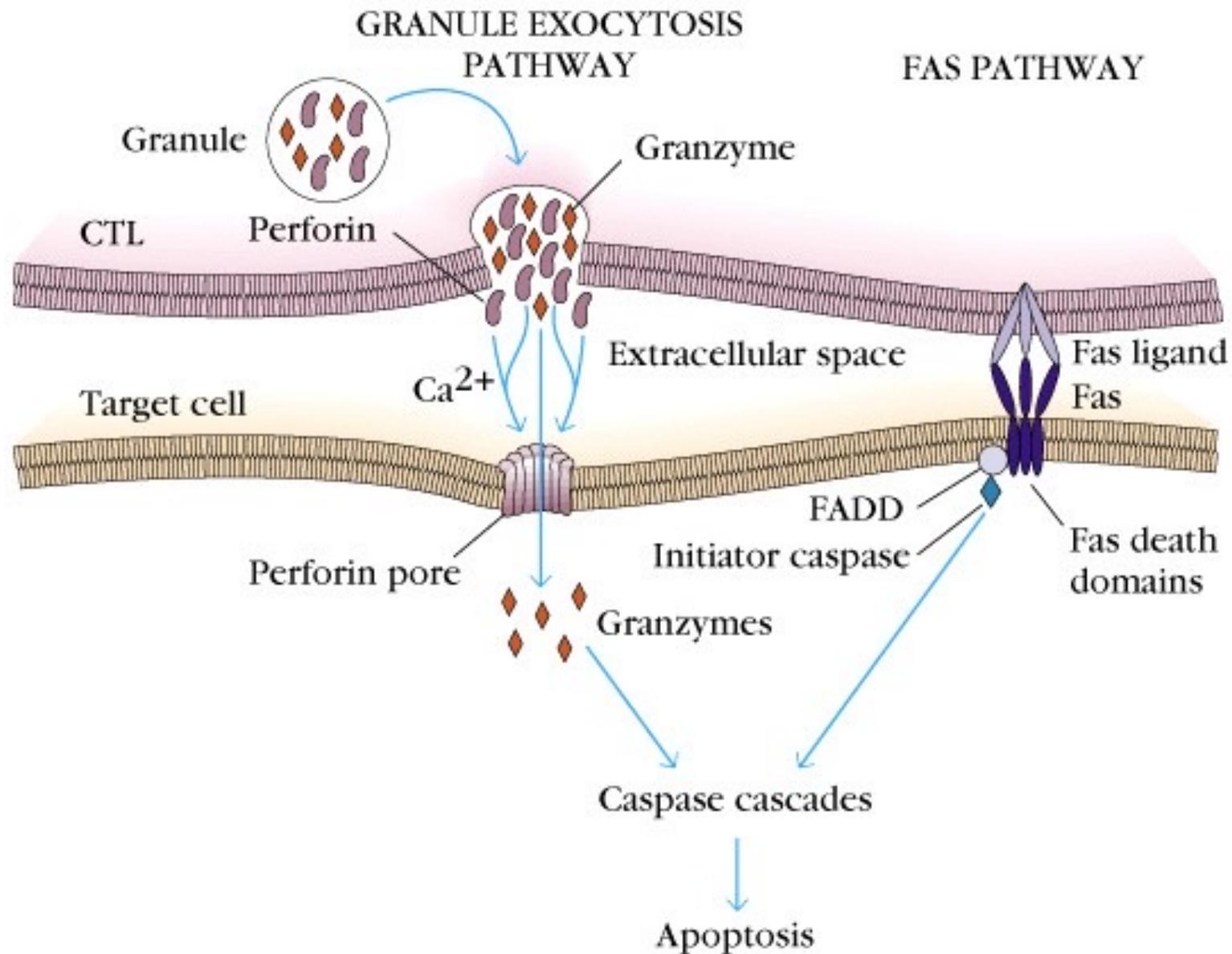
Le cellule degli “organi immunologicamente privilegiati” esprimono il ligando di Fas

Immunologically privileged sites
Brain
Eye
Testis
Uterus (fetus)

# I due principali meccanismi litici dei CTL



# Cooperazione tra il meccanismo secretorio e quello mediato da FAS nel promuovere attivazione delle caspasi

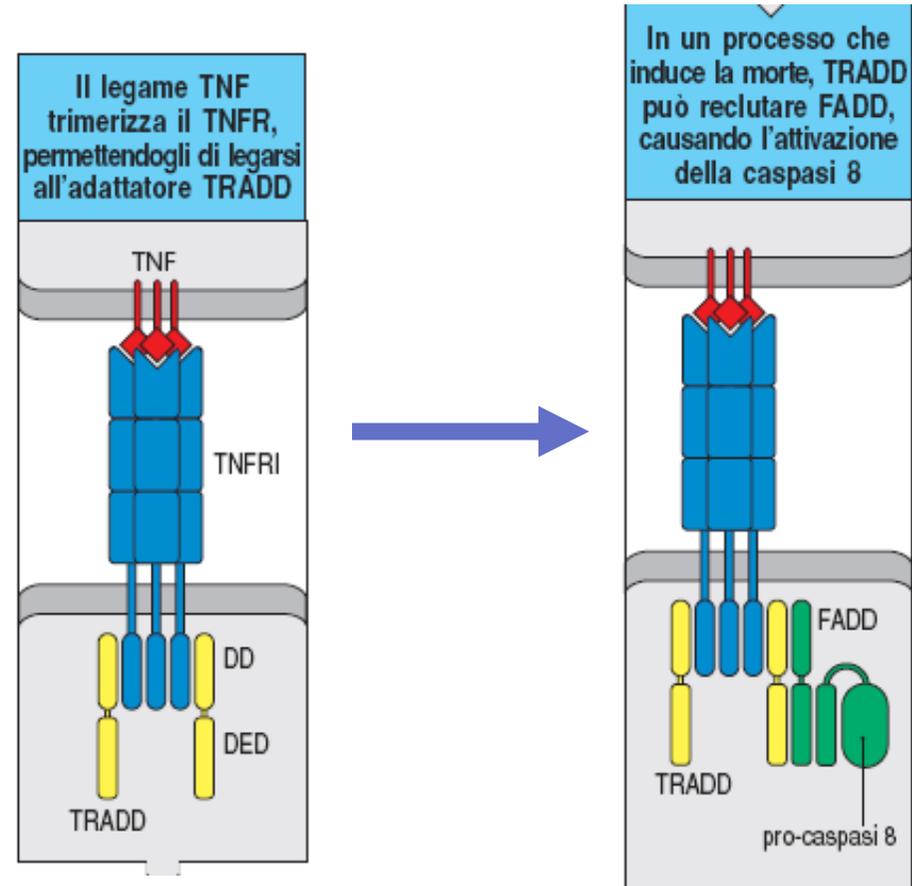
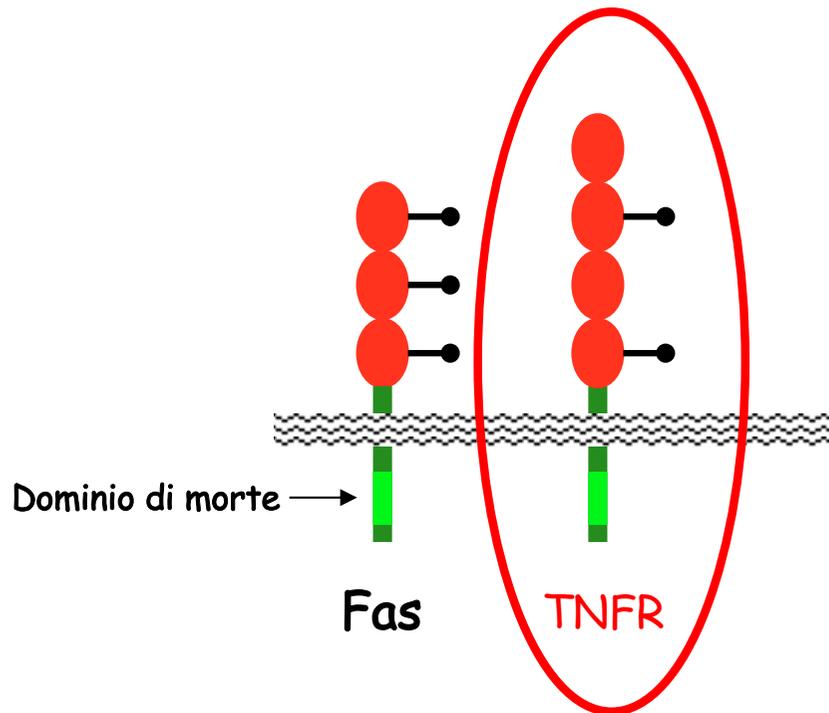


# I CTL producono anche CITOCHINE citotossiche

Tumor Necrosis Factor =

TNF  $\alpha$  e TNF  $\beta$

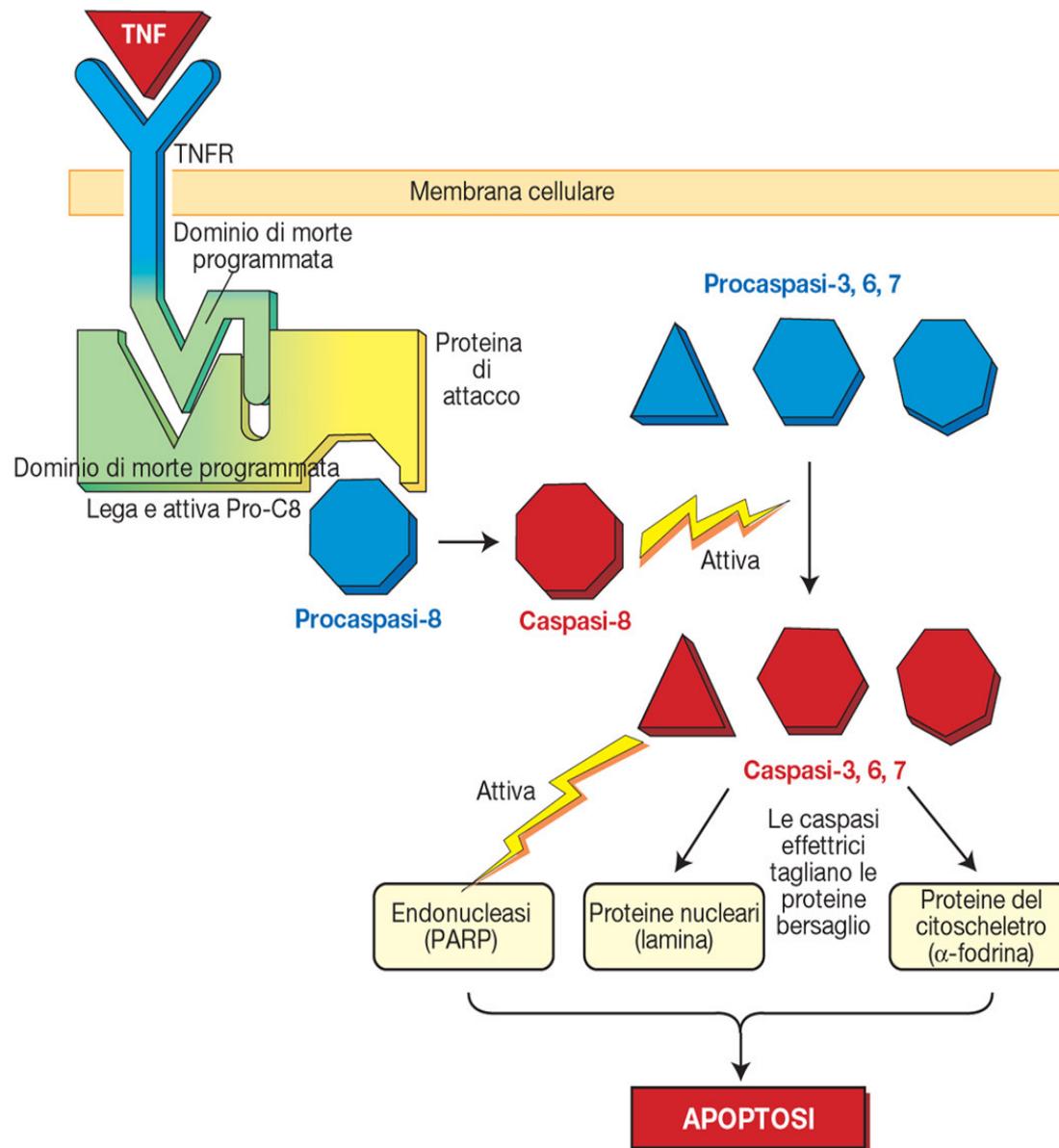
Esse inducono apoptosi dopo aver legato il loro recettore = TNFR



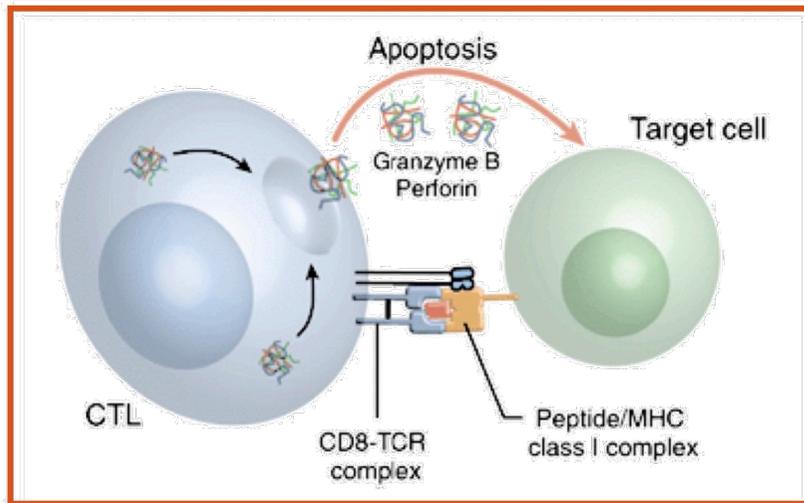
# Il TNF induce morte per apoptosi della cellula bersaglio

**T**umor **N**ecrosis **F**actor =  
TNF

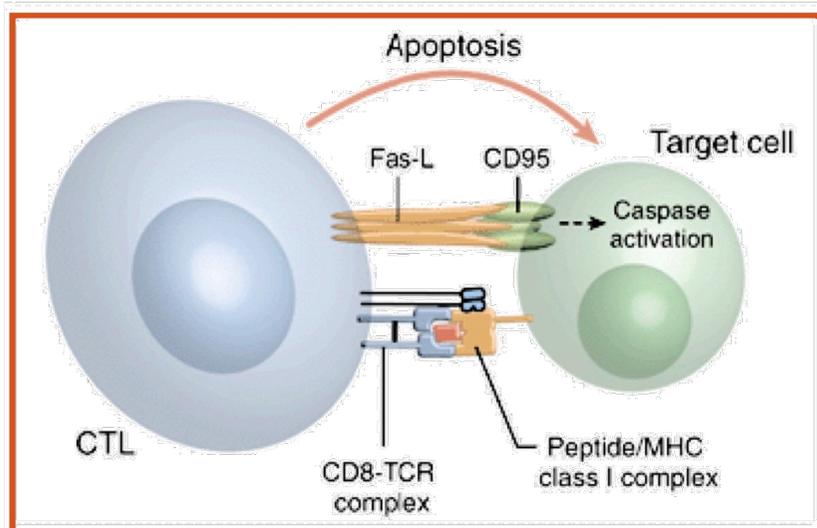
Induce apoptosi dopo aver  
legato il suo recettore = TNFR



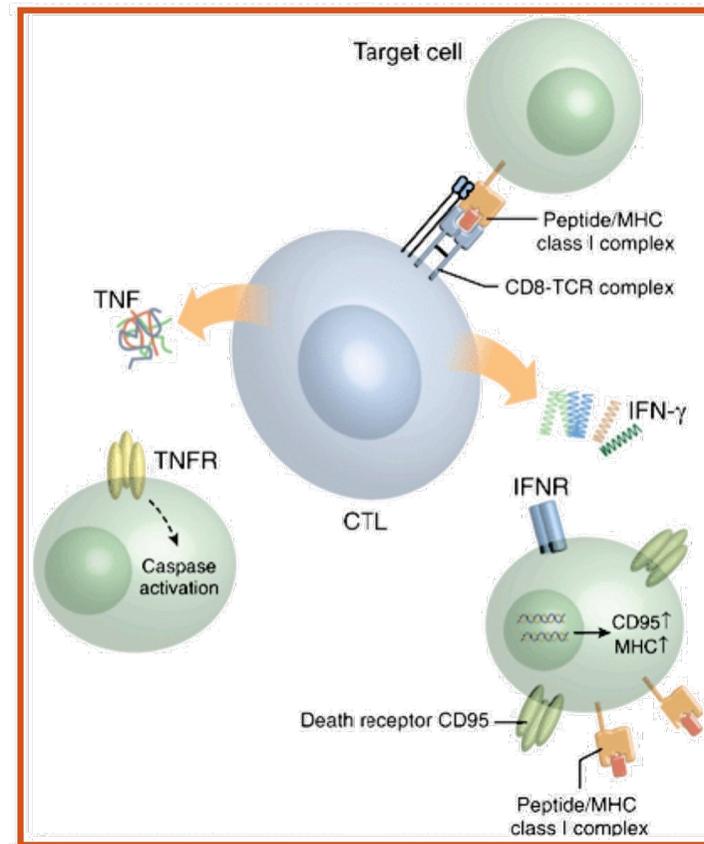
# Citotossicità mediata dai linfociti CTL



**Direct killing** by release of granzyme B and perforin into the intercellular space between CTL and target cell

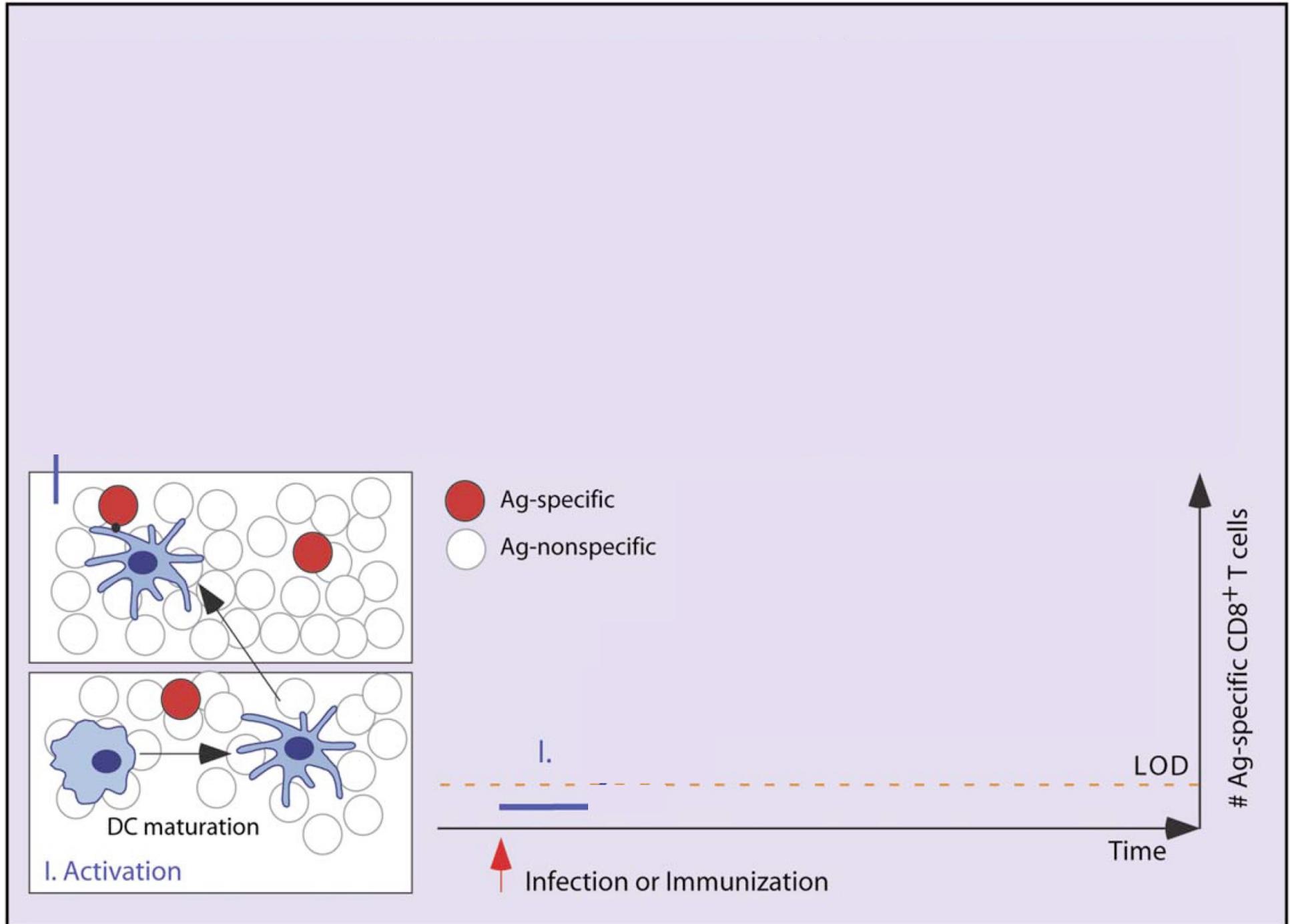


**Induction of apoptosis** in target cells via death receptor triggering

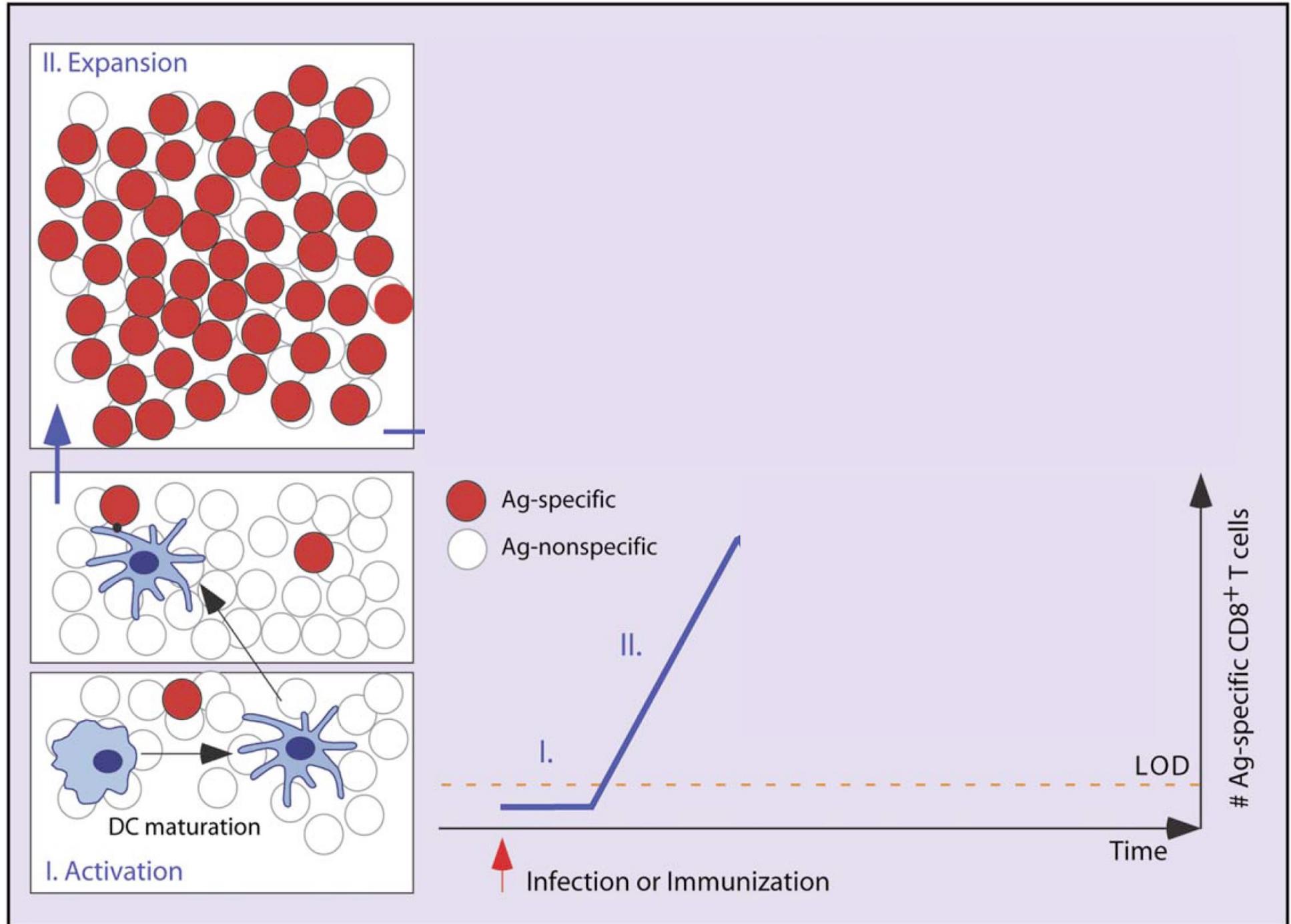


**Indirect killing** of target cells by release of Tumor Necrosis Factor-alpha and IFN-gamma

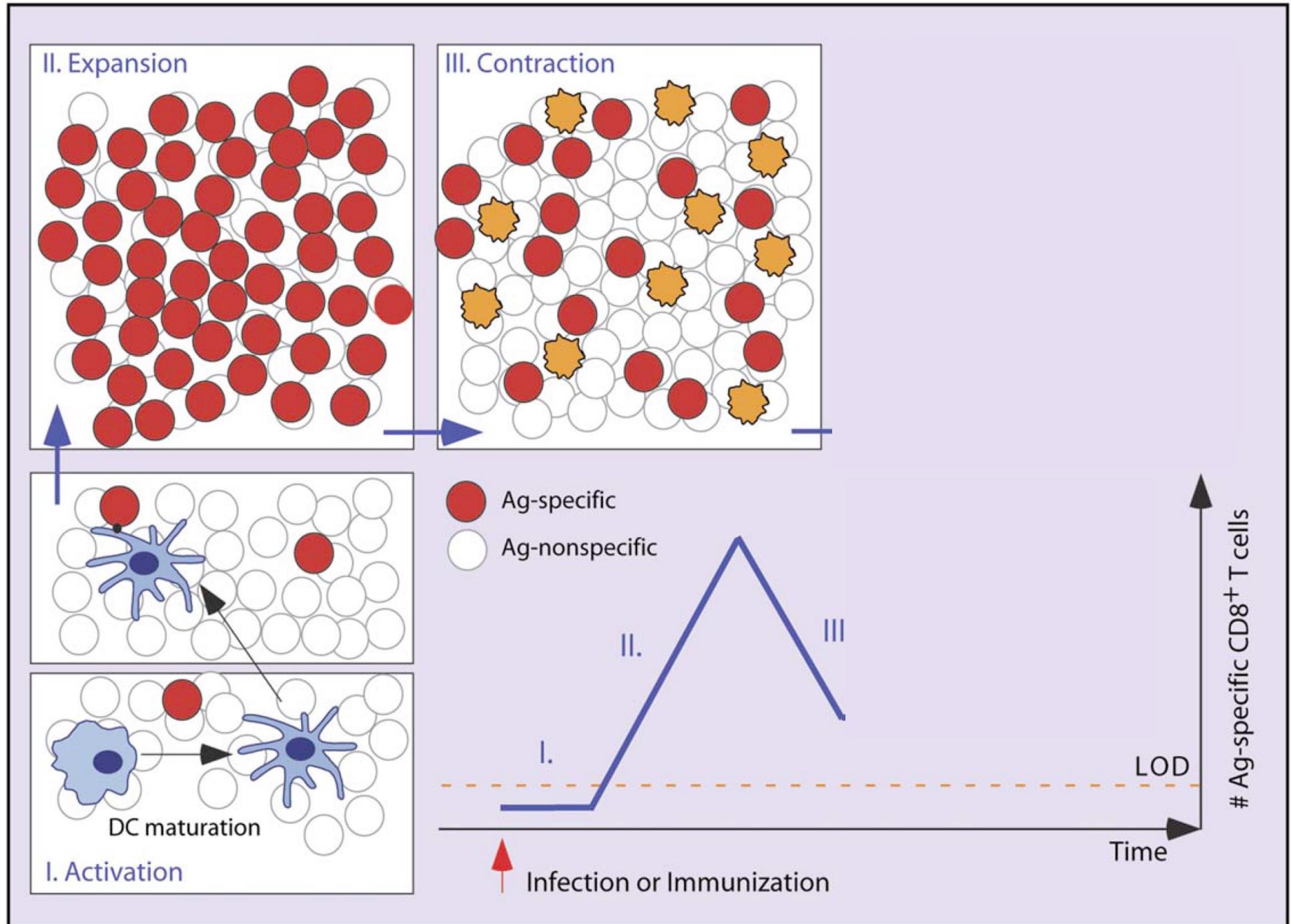
# Naive-to-memory progression after acute infection



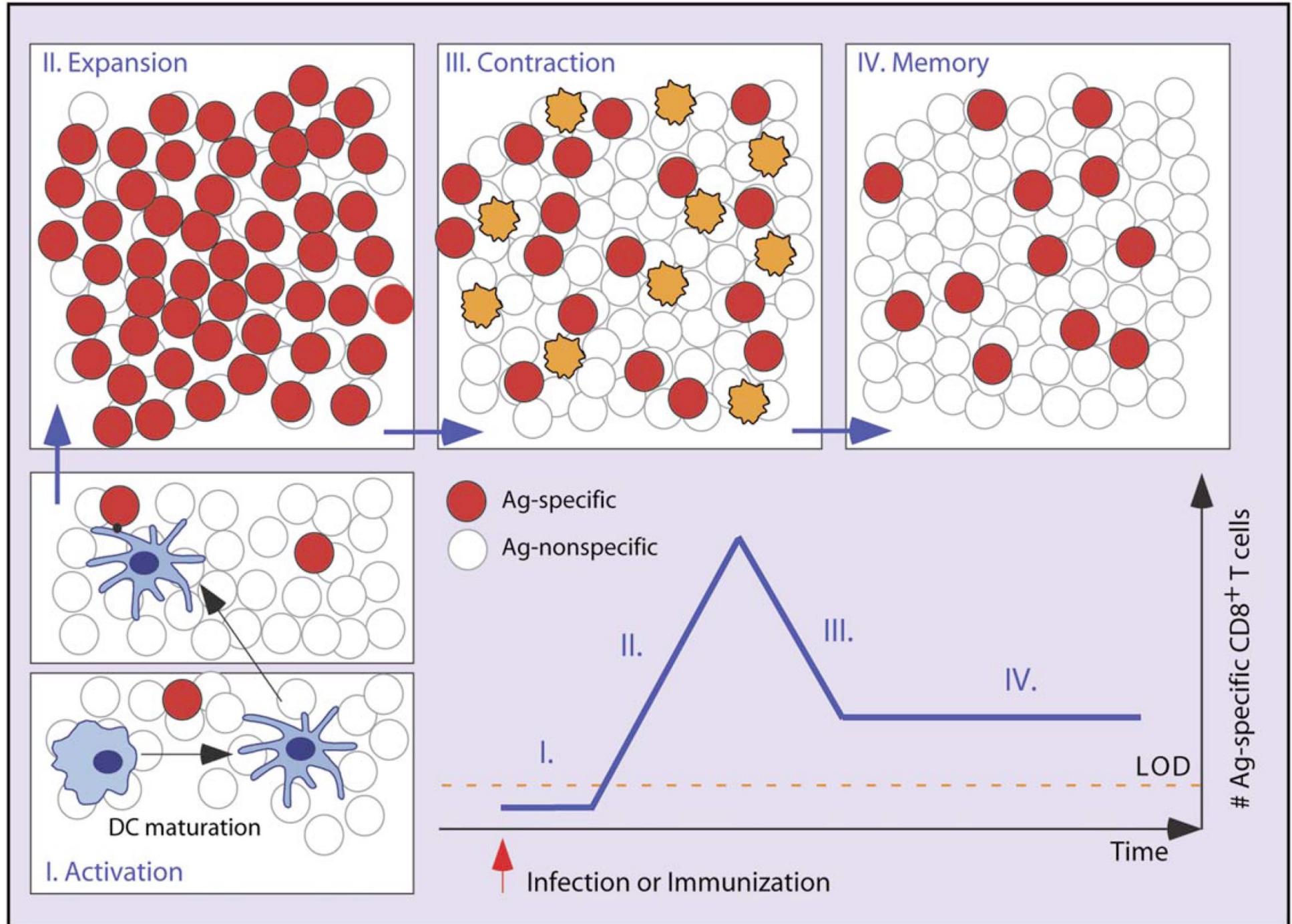
# Naive-to-memory progression after acute infection



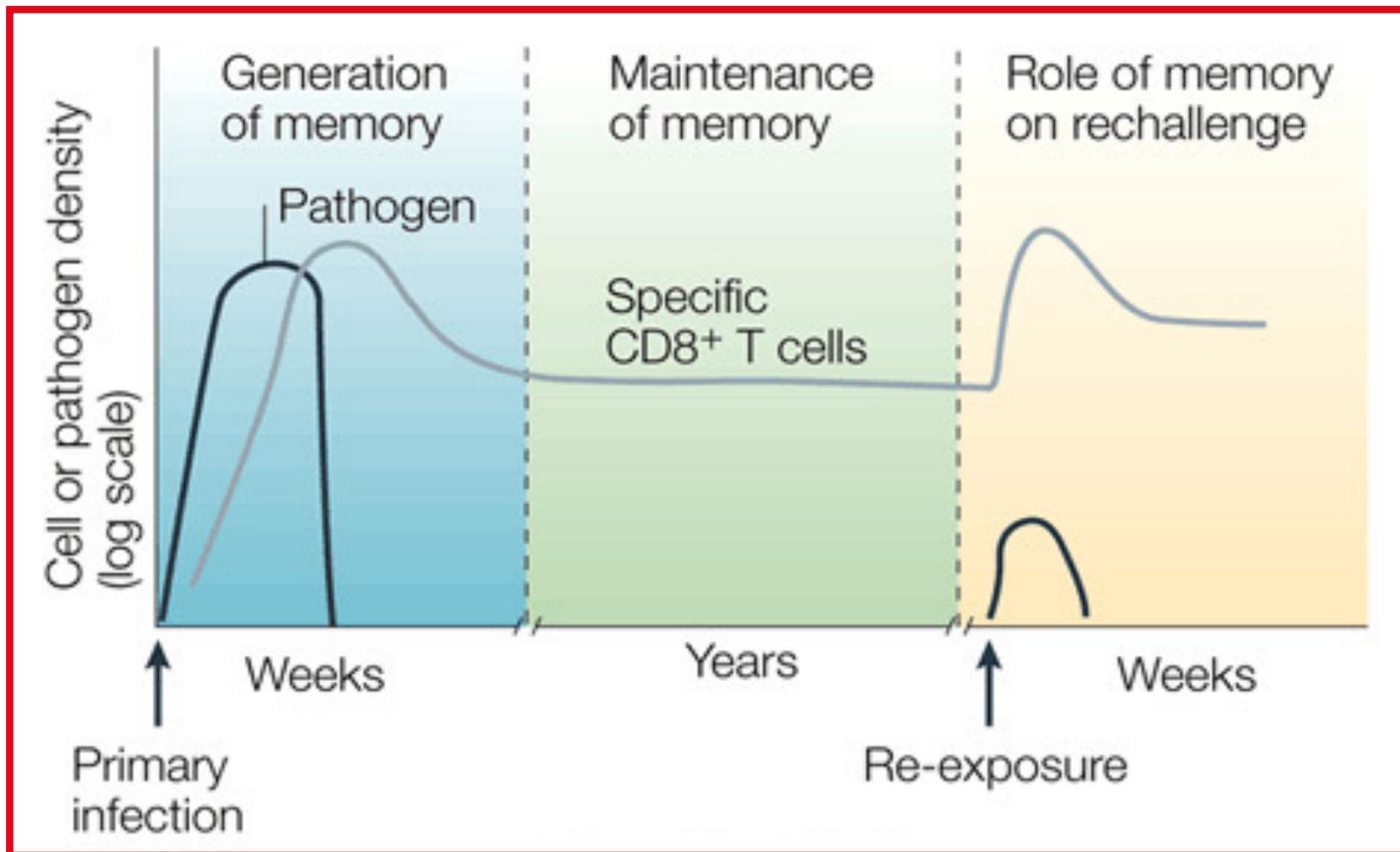
# Naive-to-memory progression after acute infection



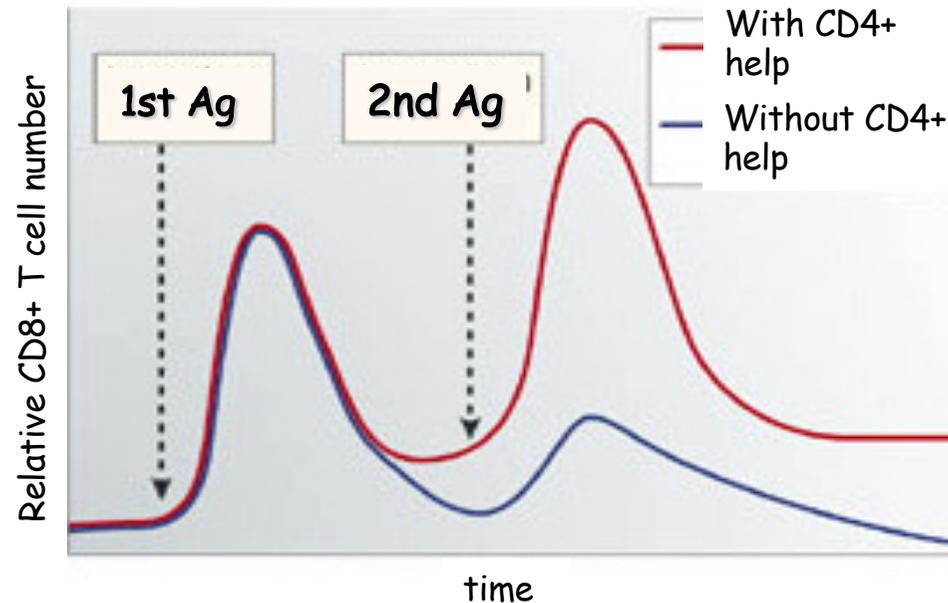
# Naive-to-memory progression after acute infection



# Attivazione dei CTL della memoria

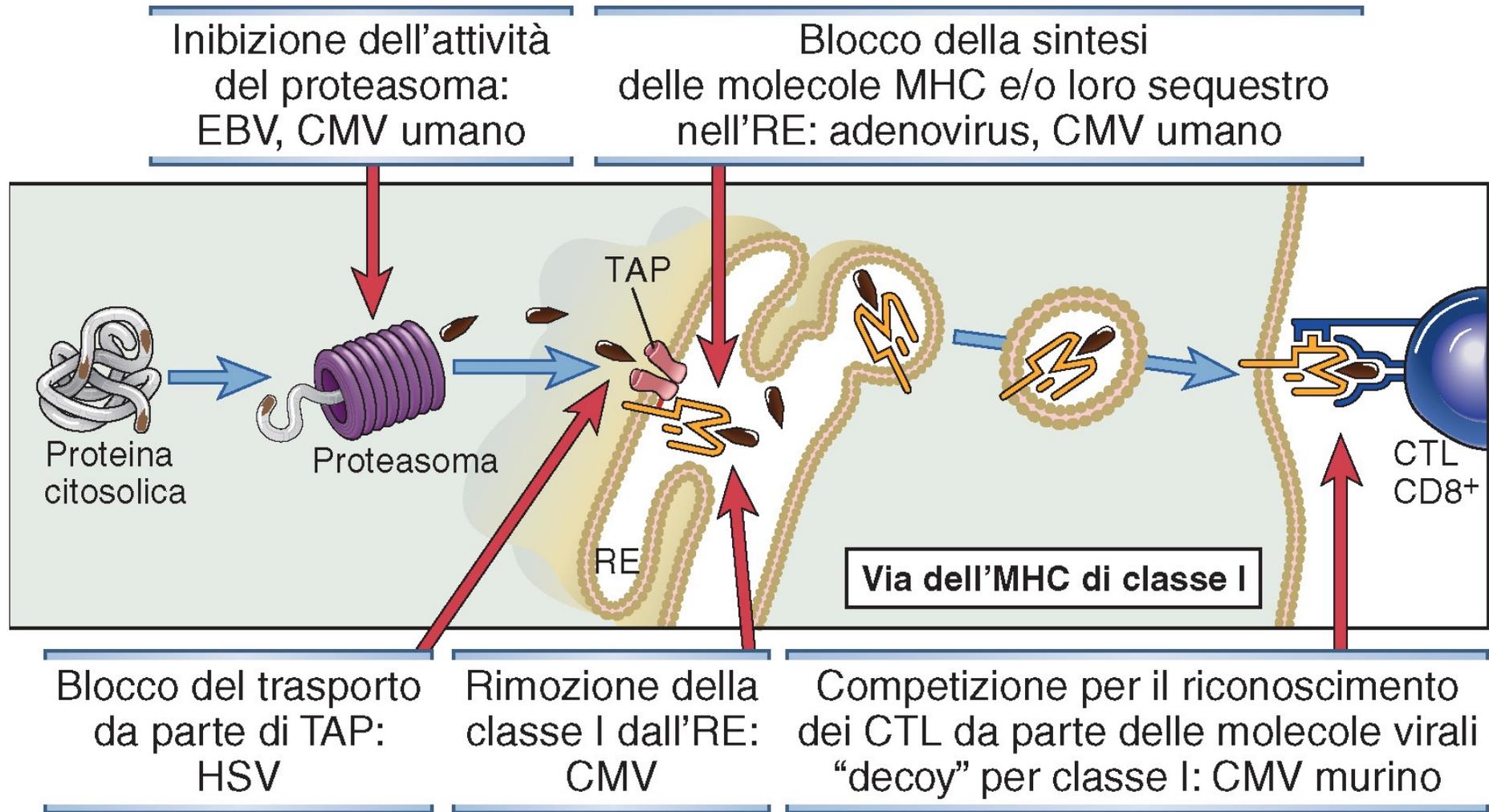


The primary CTL response is independent of CD4+ T-cell help; the development of secondary responses requires CD4+ T-cell help



Viral antigen  
(strongly immunogenic)

# Meccanismi utilizzati dai virus per inibire la risposta dei CTL

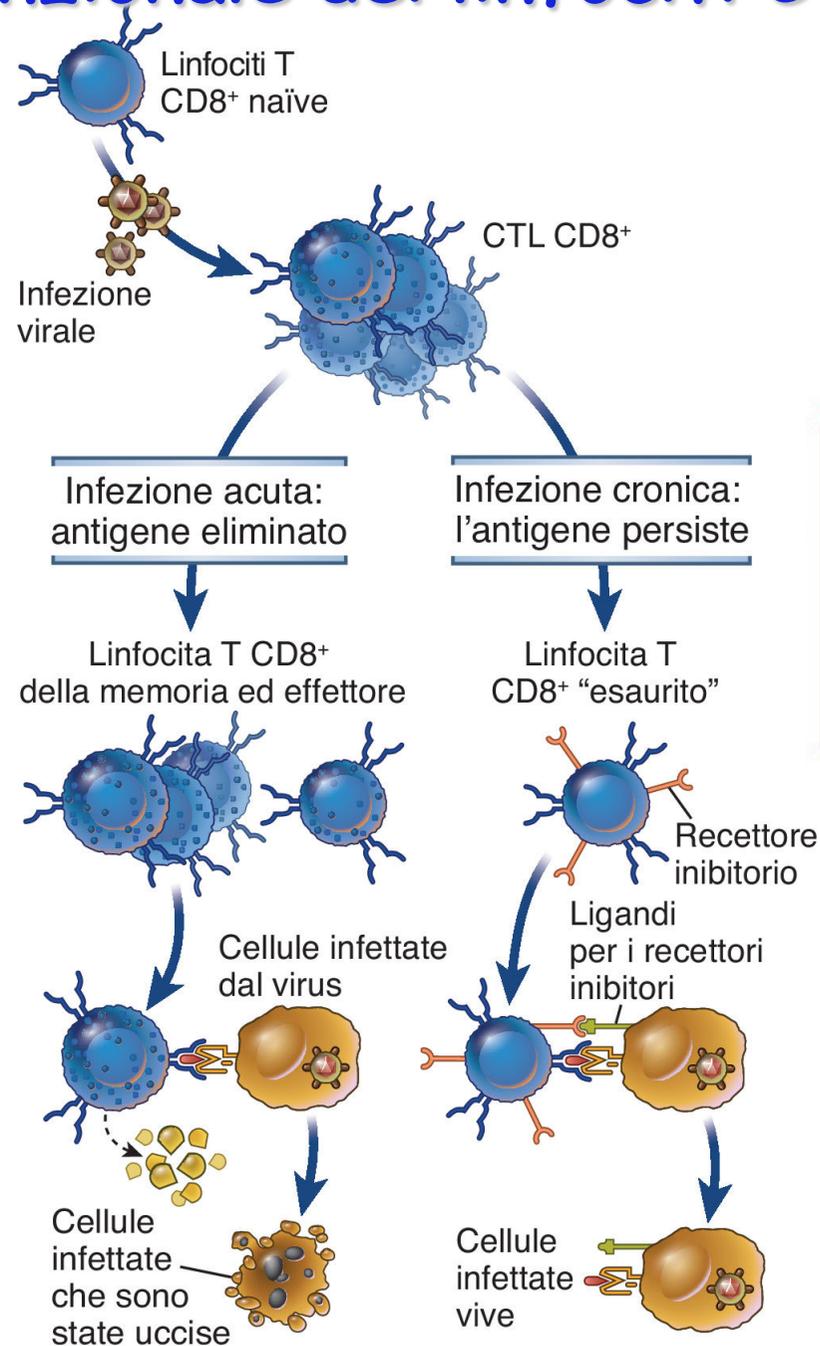


HSV= Virus Herpes Simplex

EBV= Virus di Epstein-Barr

CMV= Citomegalovirus

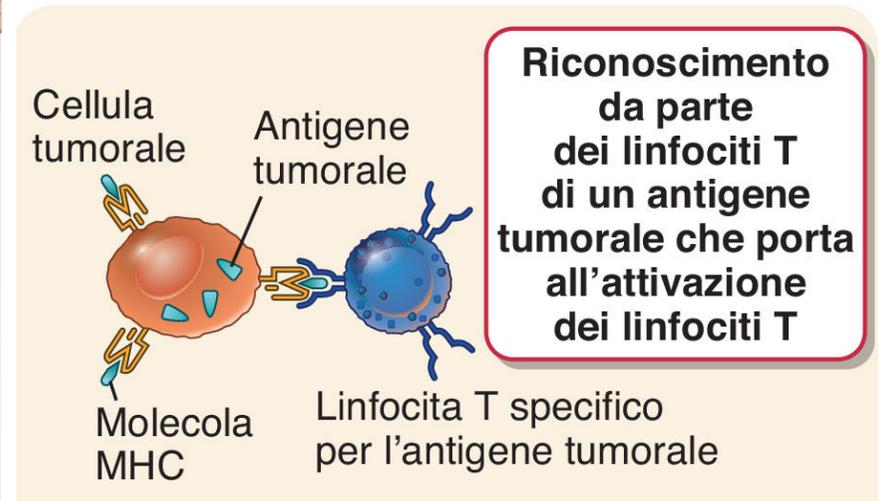
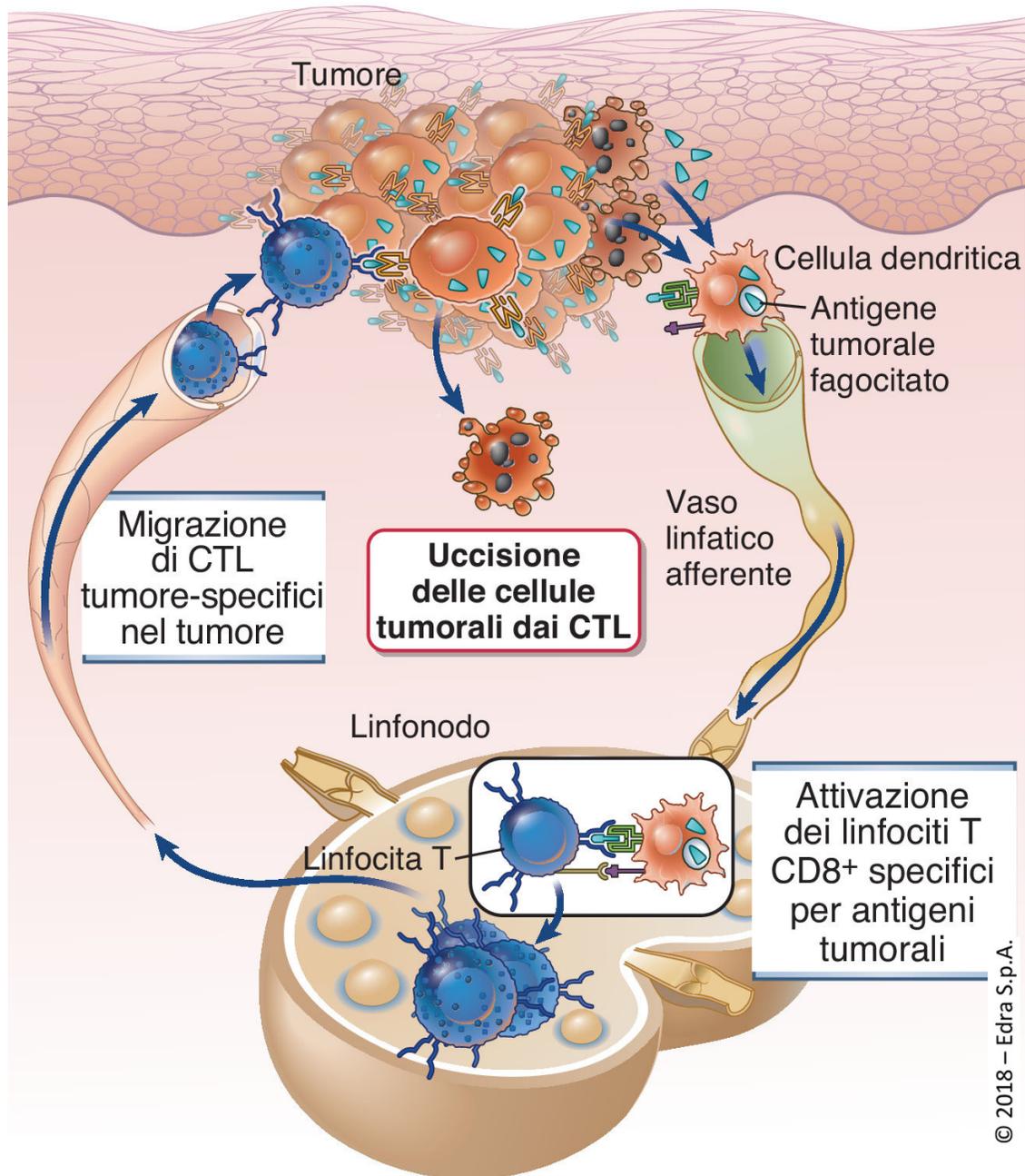
# L'infezione cronica può causare l'esaurimento funzionale dei linfociti CTL



**Esaurimento funzionale dei linfociti T: espressione di recettori inibitori; incapacità di rispondere alle cellule infettate da virus**

**CTL effettori e della memoria: possono rispondere al virus tramite la secrezione di citochine, la proliferazione e l'uccisione del bersaglio**

# I CTL riconoscono ed uccidono anche cellule tumorali

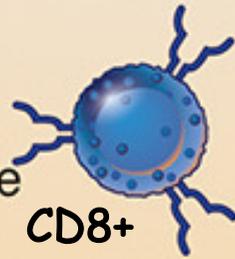


# Meccanismi utilizzati dai tumori per evadere la risposta dei CTL

## Difetto di presentazione degli antigeni tumorali

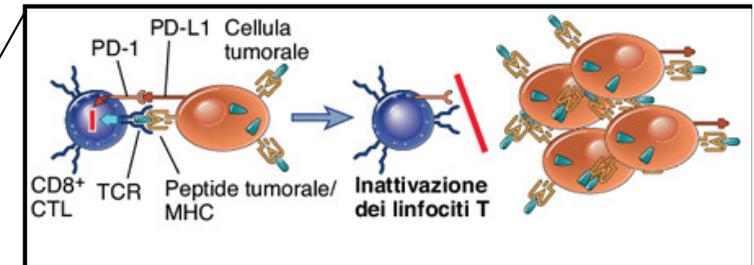


Cellula tumorale  
priva dell'MHC  
di classe I

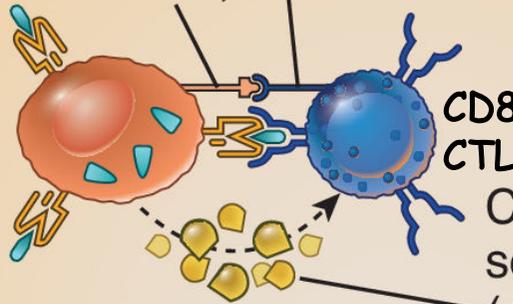


CD8+  
CTL

**Mancato  
riconoscimento  
del tumore  
da parte  
dei linfociti T**

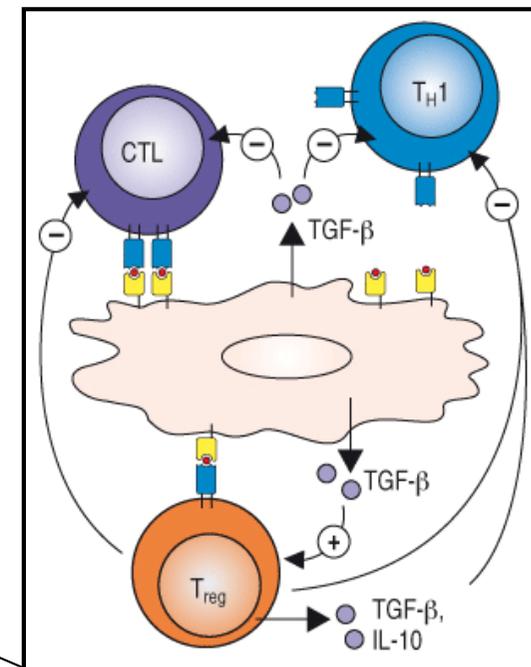


**Produzione di proteine immunosoppressive  
o espressione di proteine inibitorie di membrana**  
Ligandi inibitori Recettori inibitori (per es. PD-1)  
(per es. PD-L1)



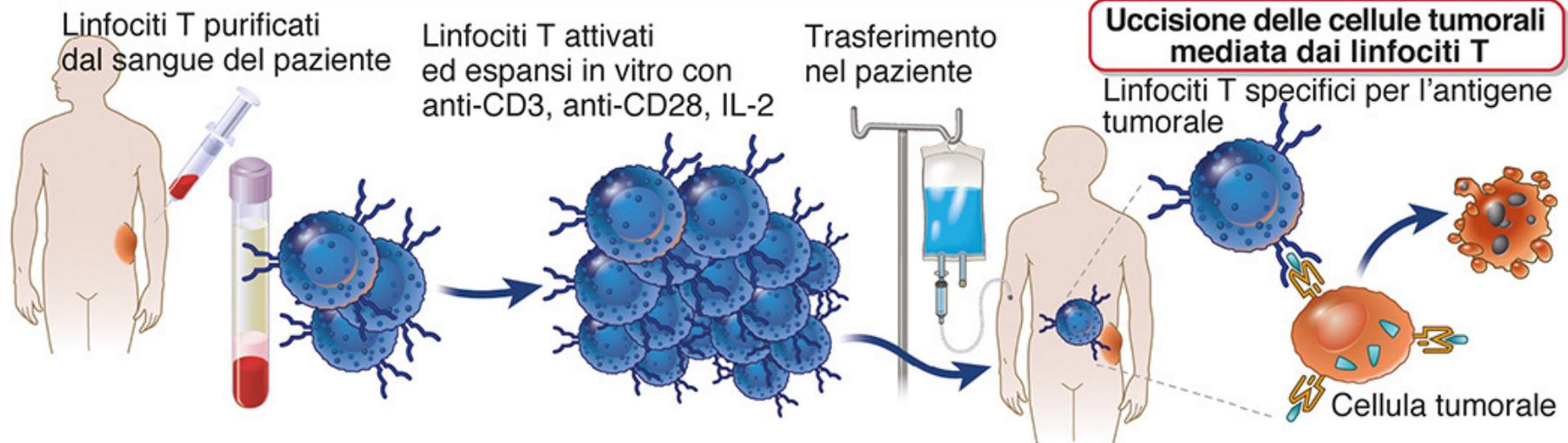
**Inibizione  
dell'attivazione  
dei linfociti T**

Citochine immuno-  
soppressive  
(per es. TGF- $\beta$ )

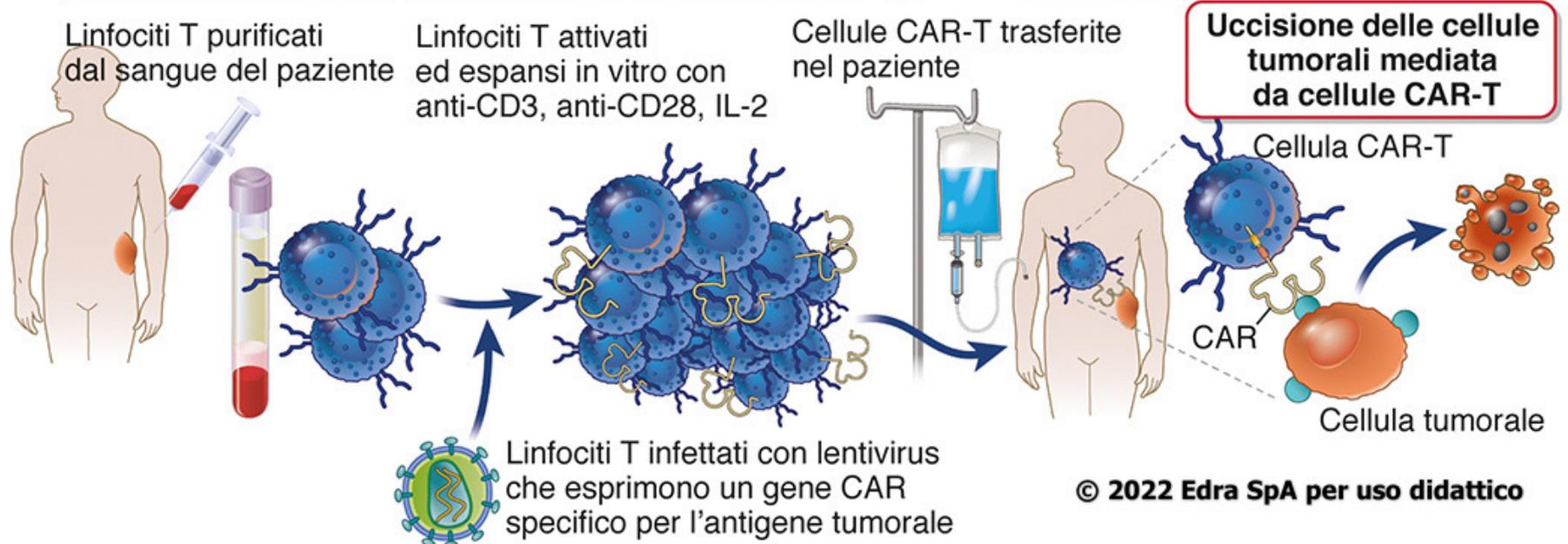


# Impiego di linfociti killer potenziati

## A Immunoterapia con linfociti T autologhi specifici per l'antigene tumorale

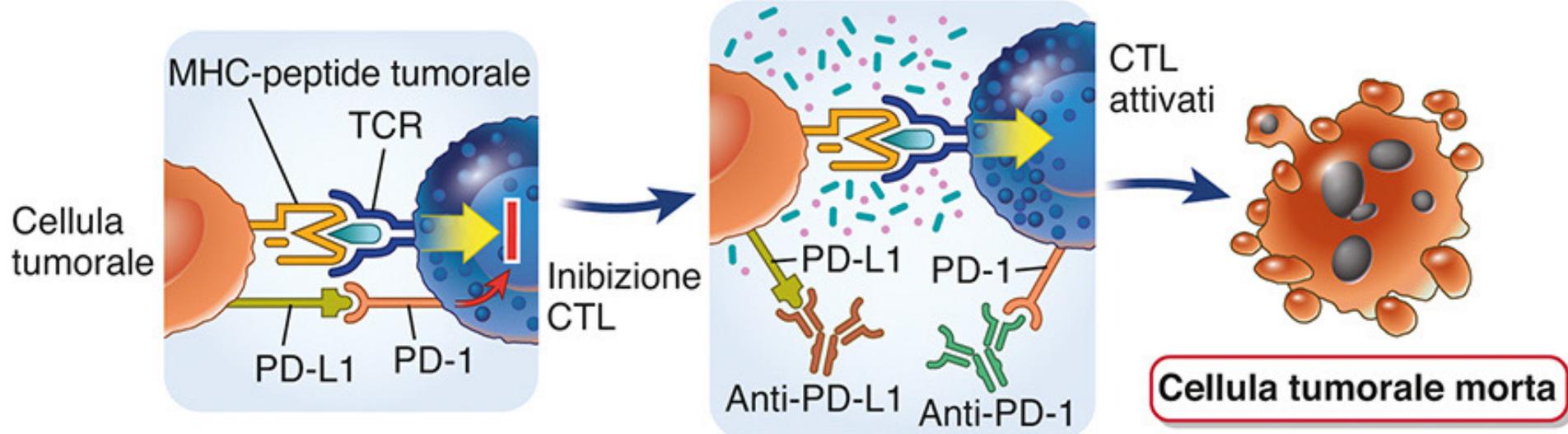


## B Immunoterapia con linfociti T con recettore dell'antigene chimerico (CAR)



La funzione dei CTL può anche essere potenziata da anticorpi monoclonali che bloccano recettori inibitori:  
**"I checkpoints dei linfociti T"**

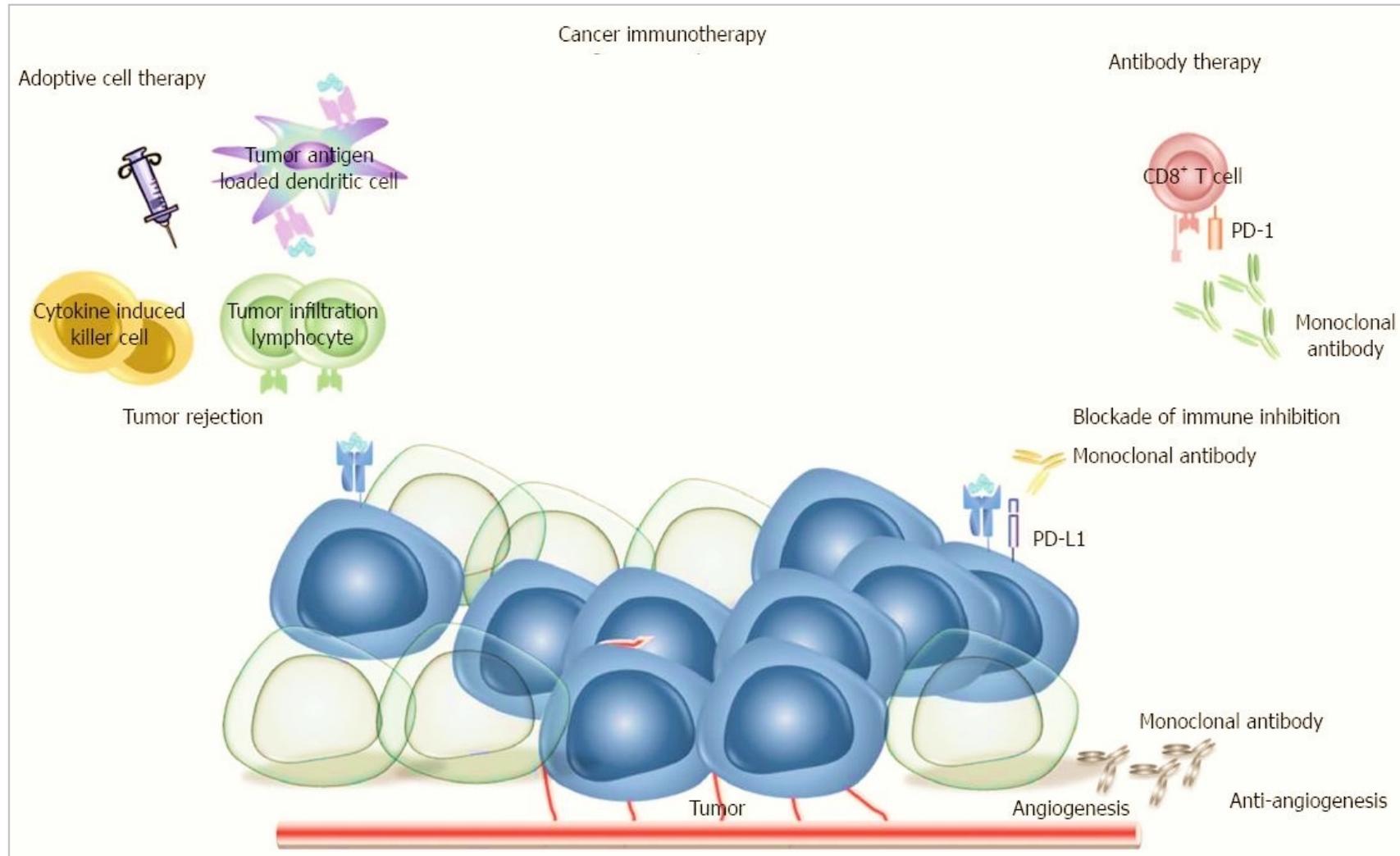
**Uccisione delle cellule tumorali da parte dei CTL**



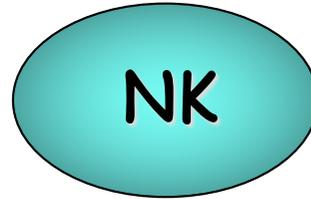
2014

# Come potenziare l'azione dei CTL??

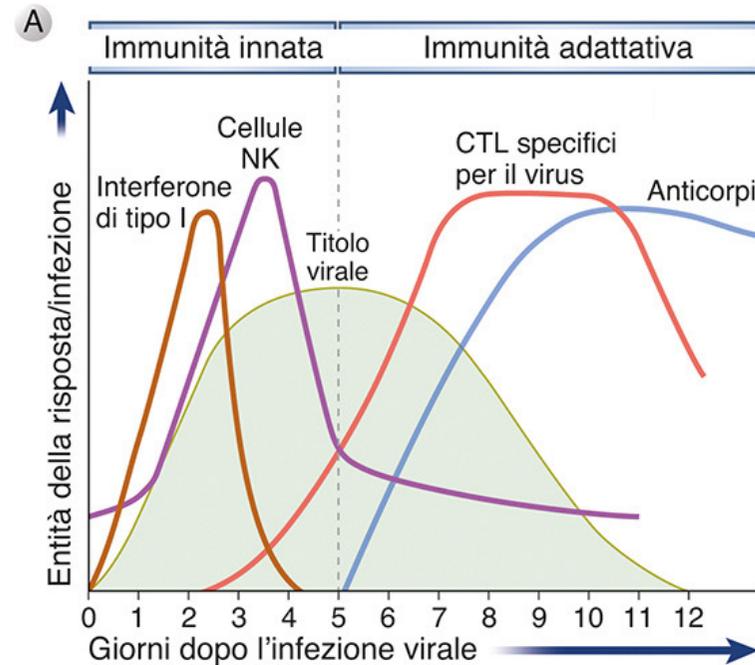
premere sull'acceleratore e bloccare i freni inibitori



# Due tipi di linfociti citotossici



- Strategie di riconoscimento differenti
- Meccanismi di attivazione distinti
- Meccanismi litici comuni



Utilizzano strategie di difesa **complementari** nei confronti di patogeni intracellulari e cellule tumorali !