

Corso di Immunologia - III anno
Prof. Paolini

Lezione 08/11/2024

"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

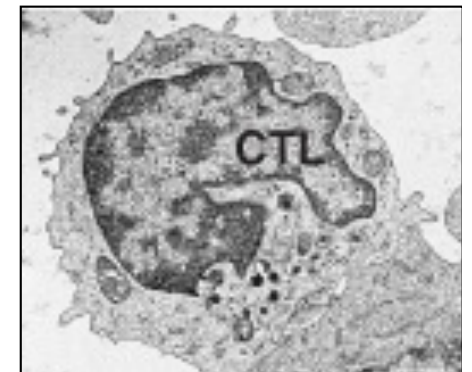
- Principali popolazioni di linfociti citotossici:

- I linfociti T CD8+

CTL

- Le cellule natural killer

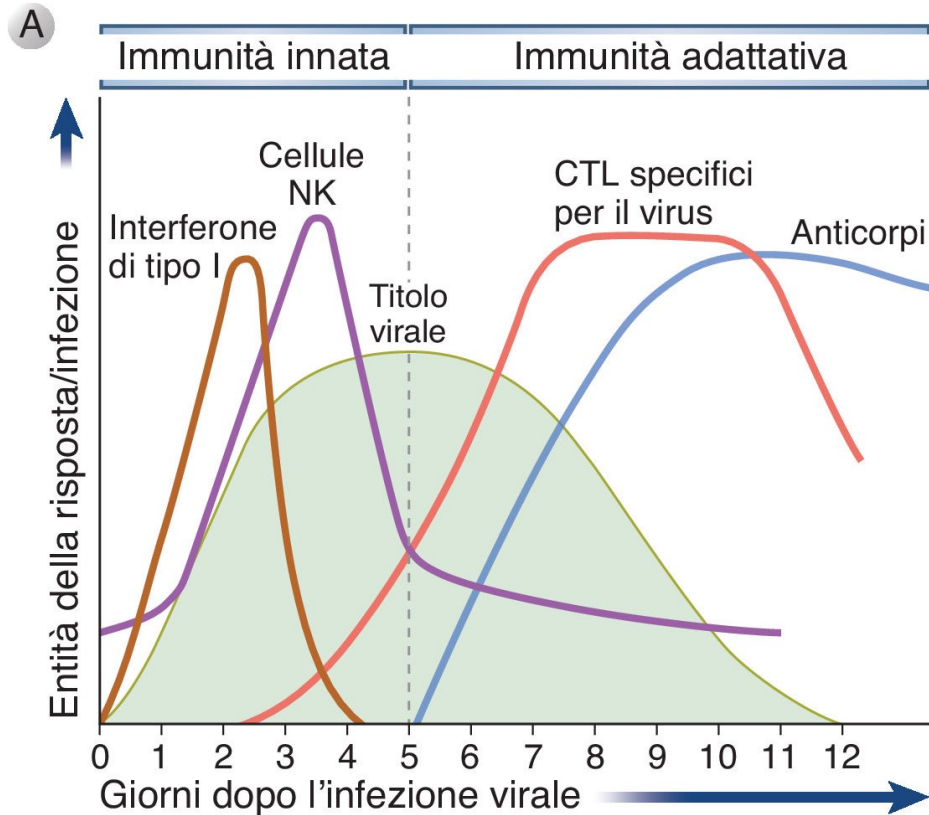
NK



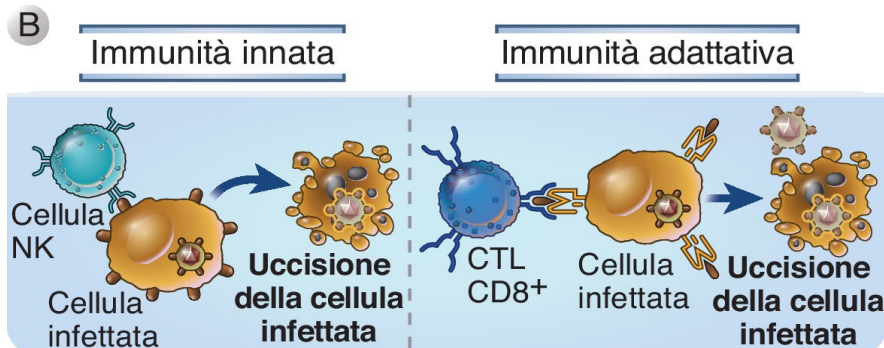
- Differenti meccanismi di riconoscimento del bersaglio

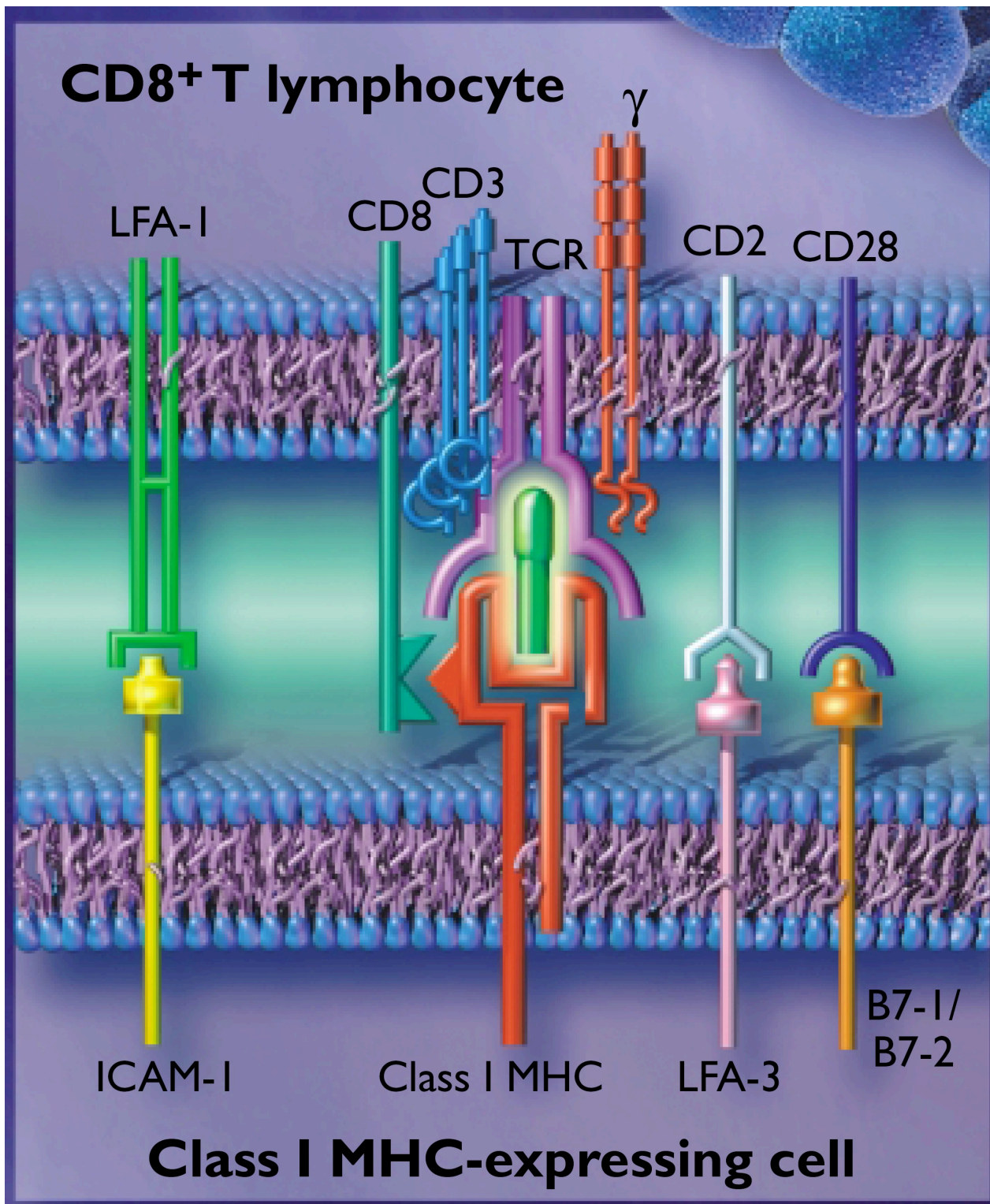
- Stessi meccanismi litici

Perché esistono differenti popolazioni di linfociti citotossici?



Strategie complementari
nella difesa contro
patogeni intracellulari!





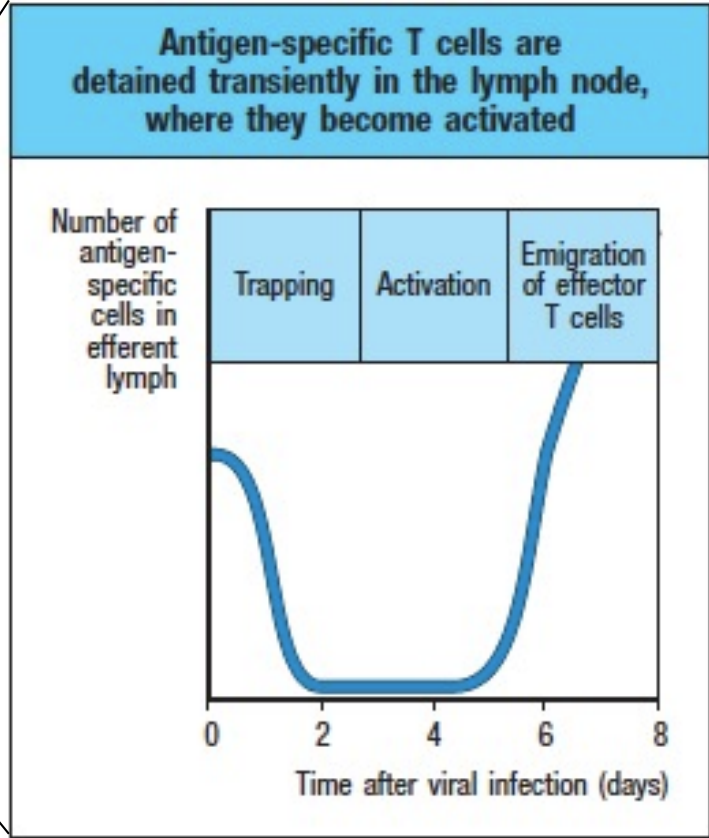
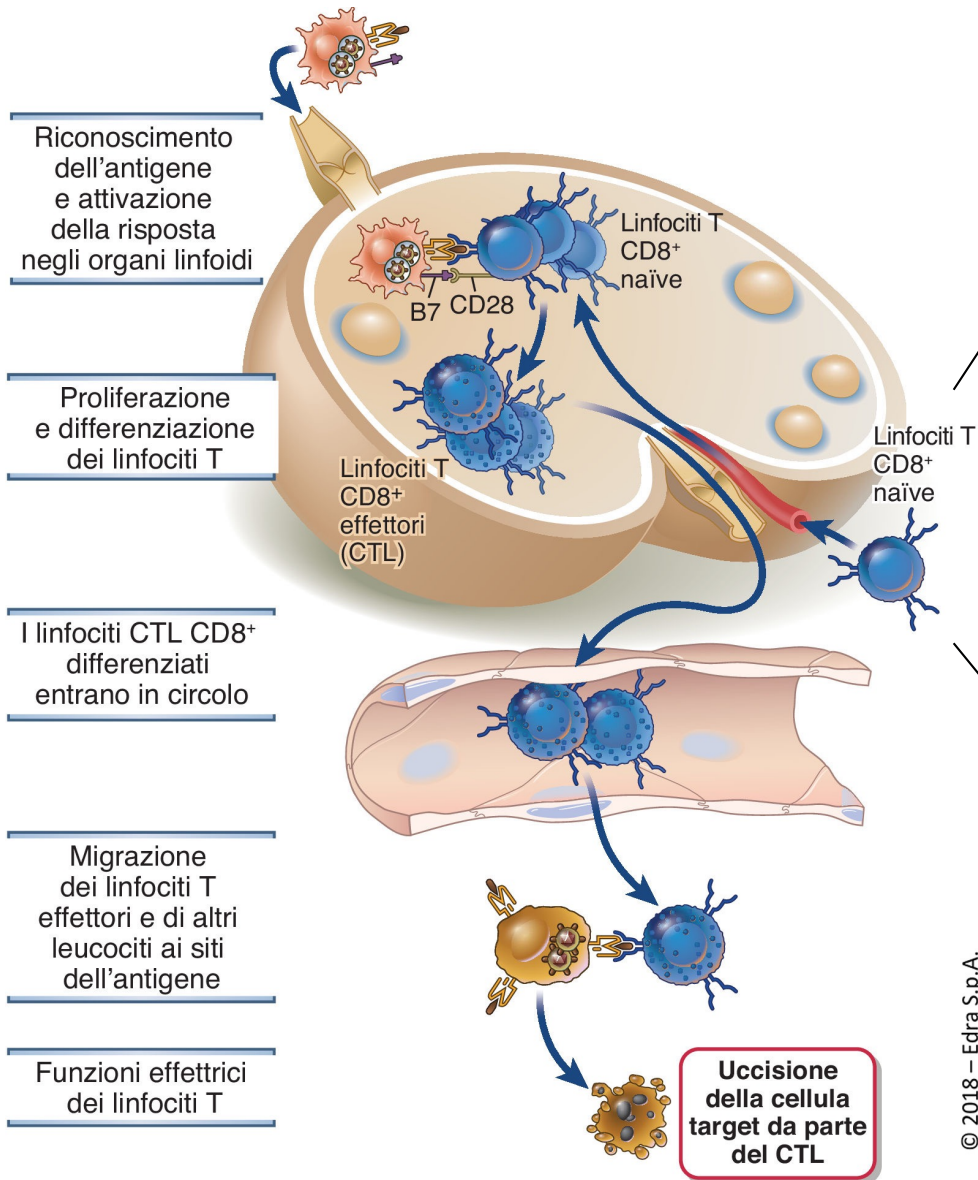
Il riconoscimento
dei linfociti
T CD8 è

specifico

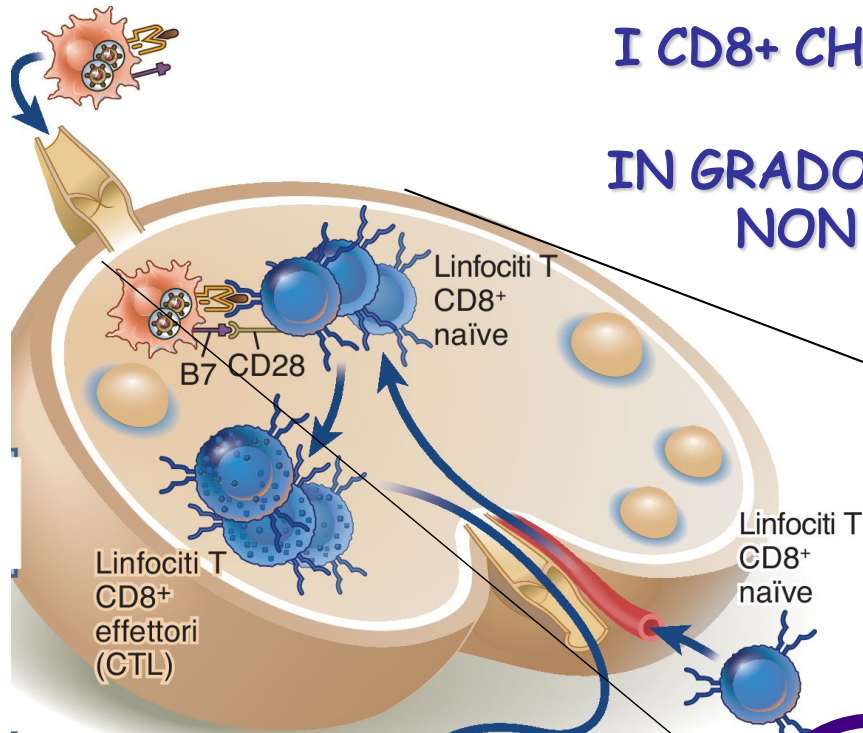
e

ristretto nei
confronti di
molecole MHC di
classe I

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

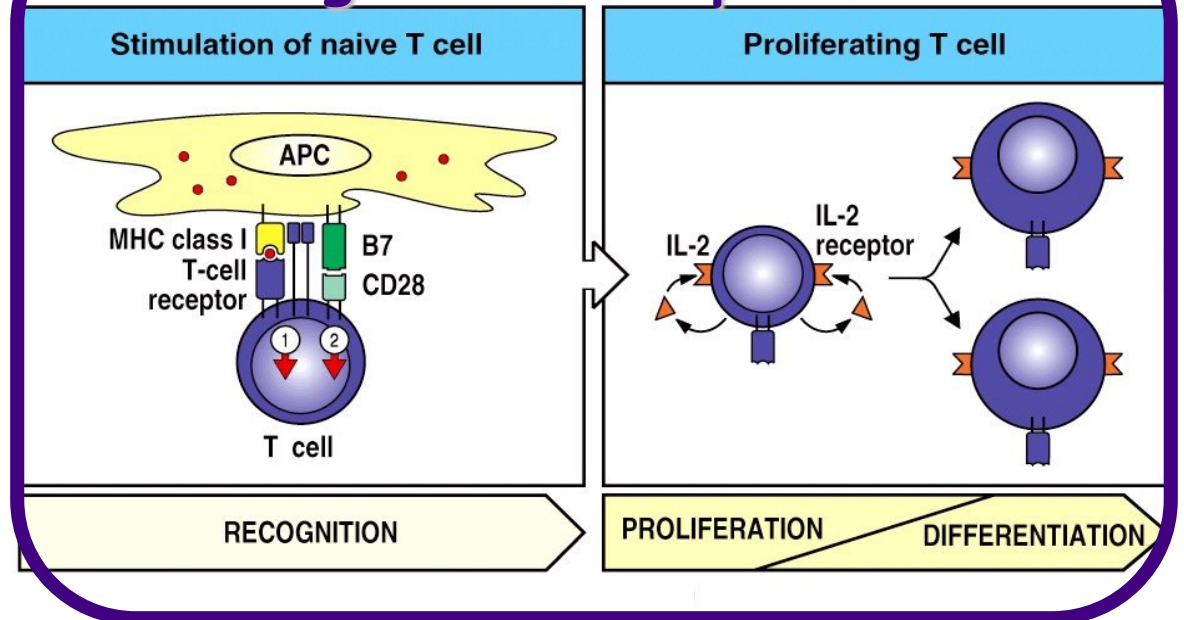


I CD8+ CHE LASCIANO IL TIMO E MIGRANO IN PERIFERIA SONO **PRE-CTL**, IN GRADO DI RICONOSCERE GLI ANTIGENI MA NON DI UCCIDERE LE CELLULE CHE LI ESPRIMONO



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

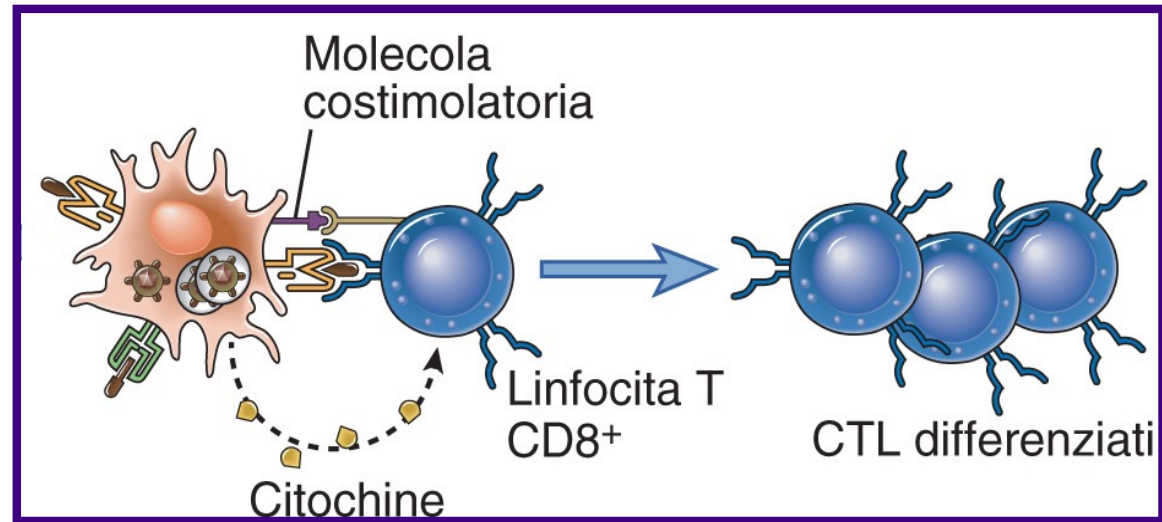
Organi linfoidi periferici



Il differenziamento dei CTL è promosso da meccanismi diversi

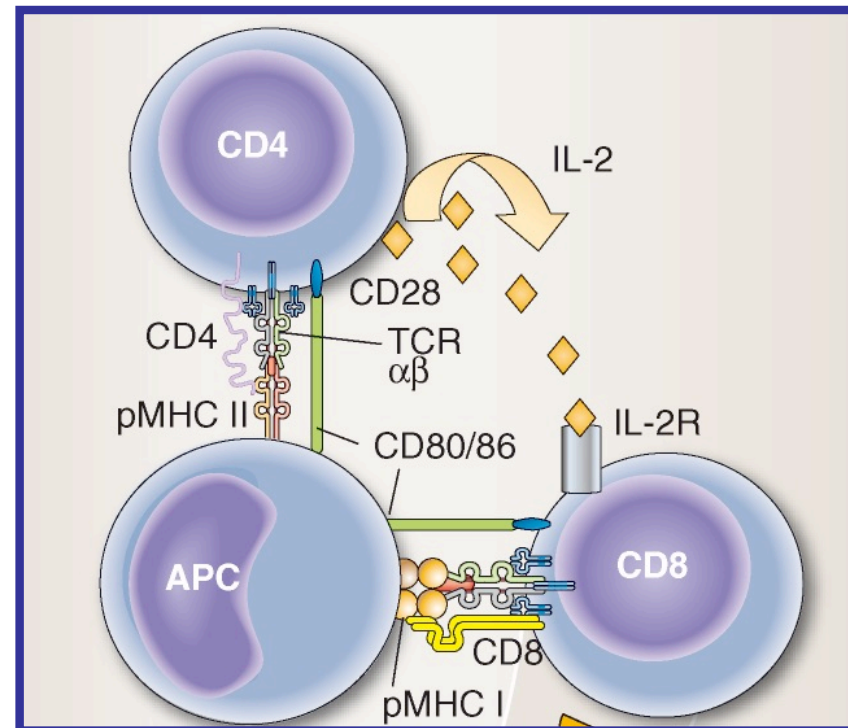
I°

Le DC da sole promuovono il differenziamento in CTL

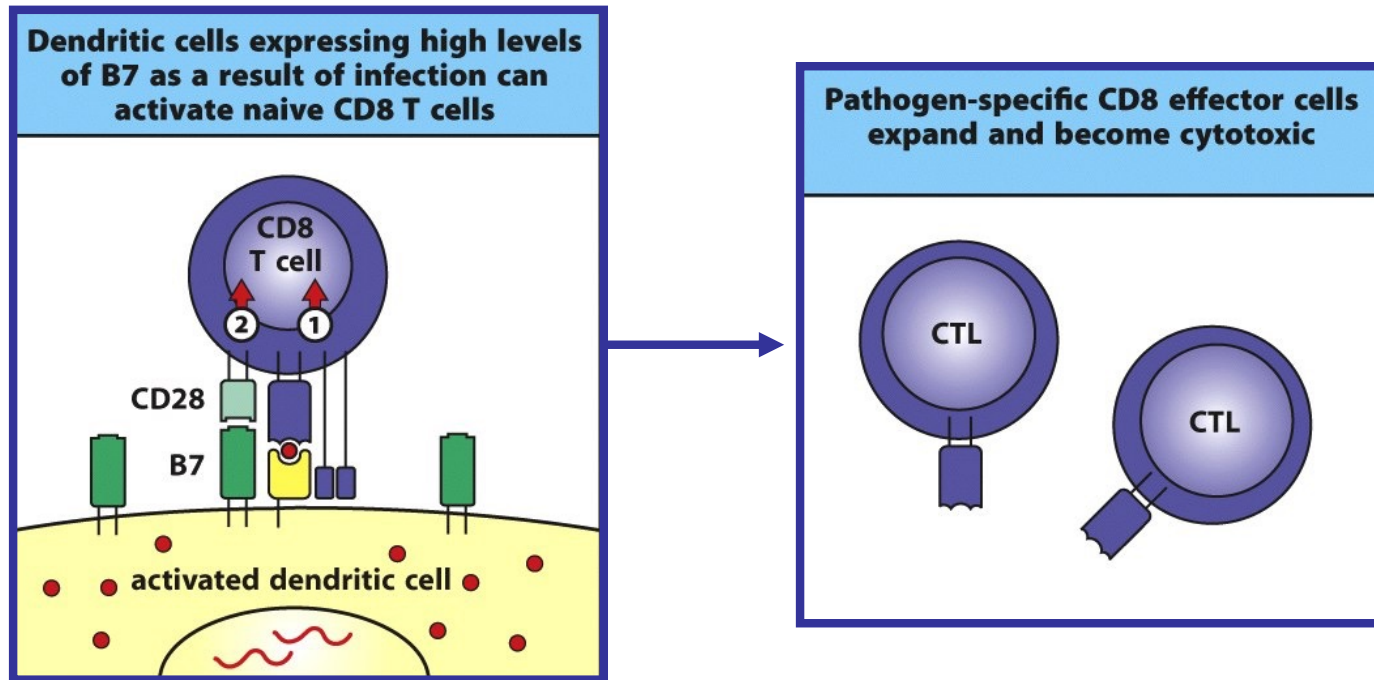


II°

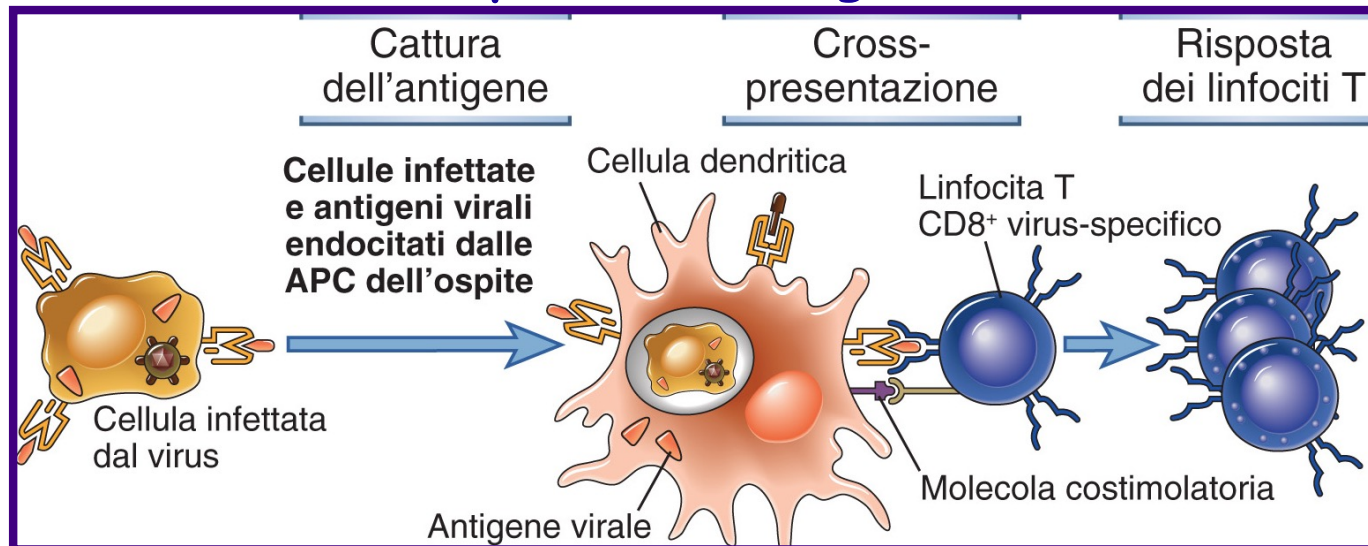
I linfociti T CD4⁺ partecipano al differenziamento in CTL



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

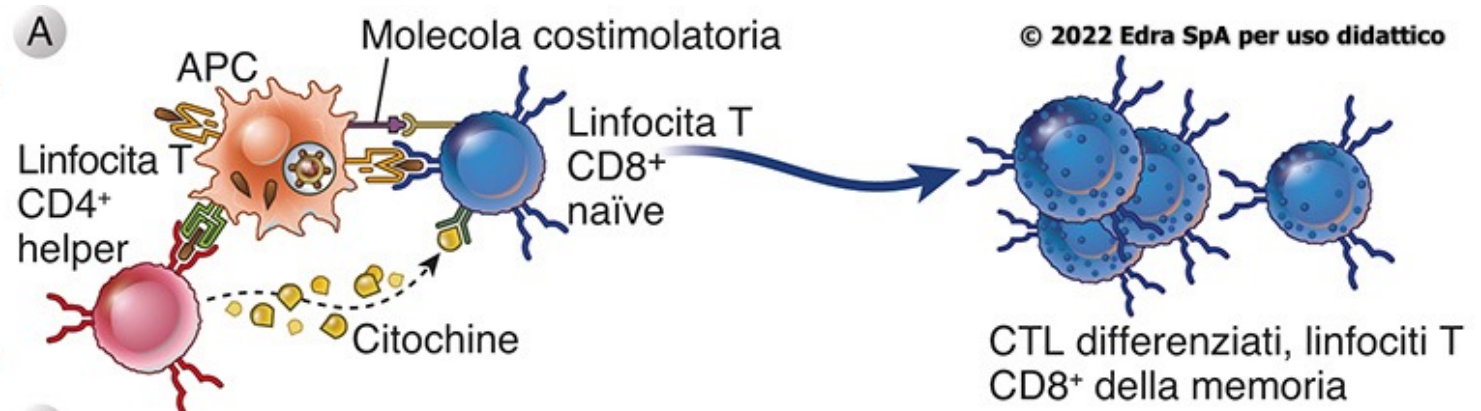


... o da una cellula dendritica non infettata che cross-presenta antigeni virali

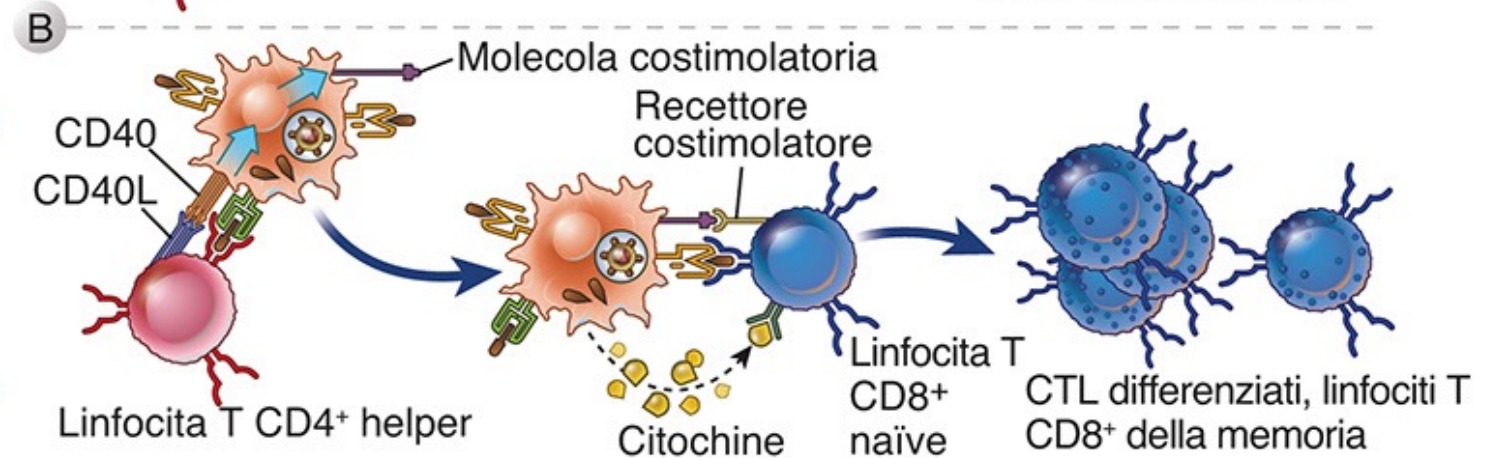


2. I linfociti T CD4+ possono contribuire all'attivazione dei linfociti T CD8+

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⁺ naive sono stimolati da una cellula dendritica

La cellula dendritica è infettata

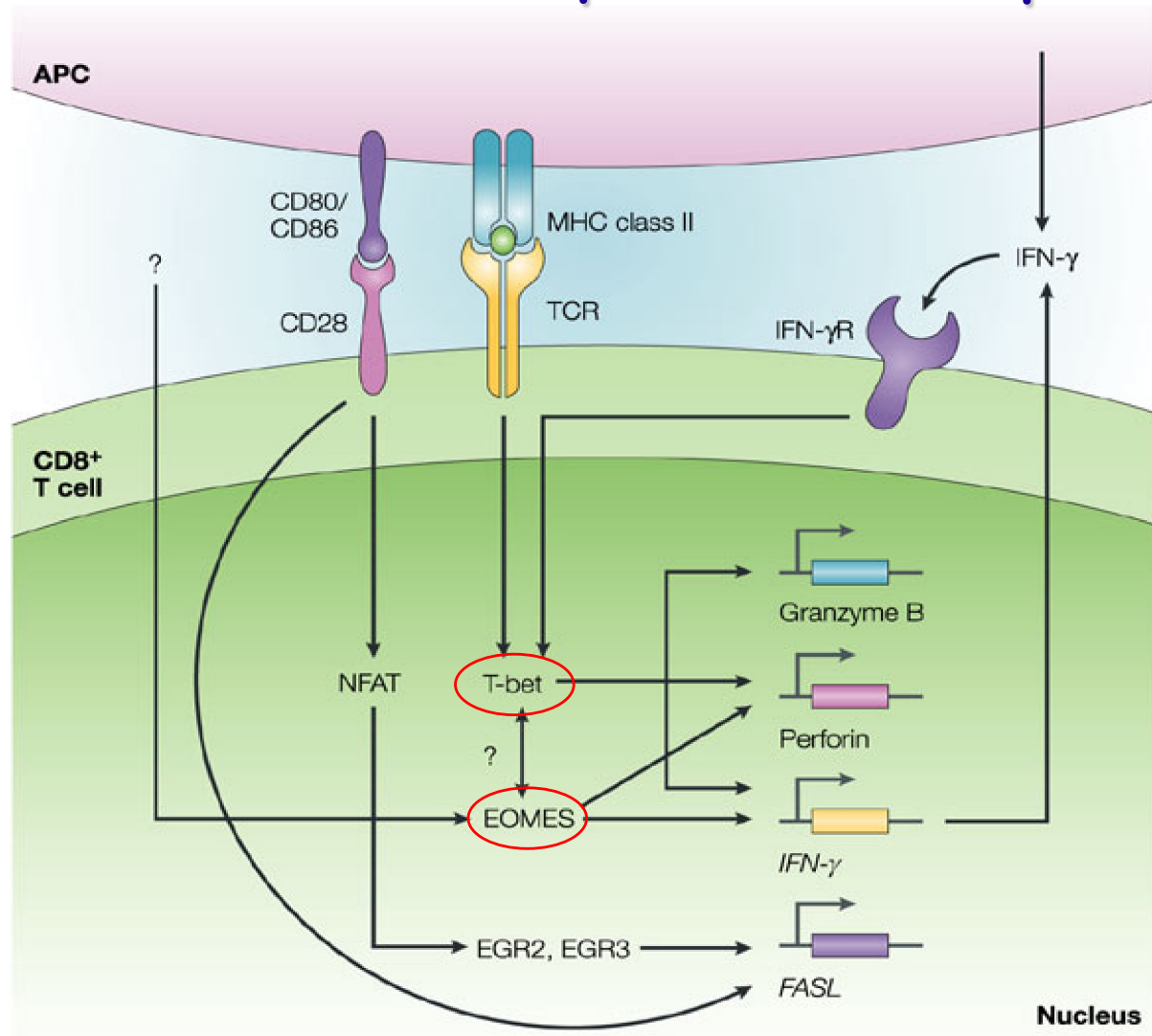
Fagocitosi di una cellula apoptotica infettata e cross-presentazione

2. I linfociti T CD4⁺ contribuiscono all'attivazione dei linfociti T CD8⁺

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_γ e TNF_β)
- Ligandi di recettori di morte (FasL)

EOMES = Eomesodermin

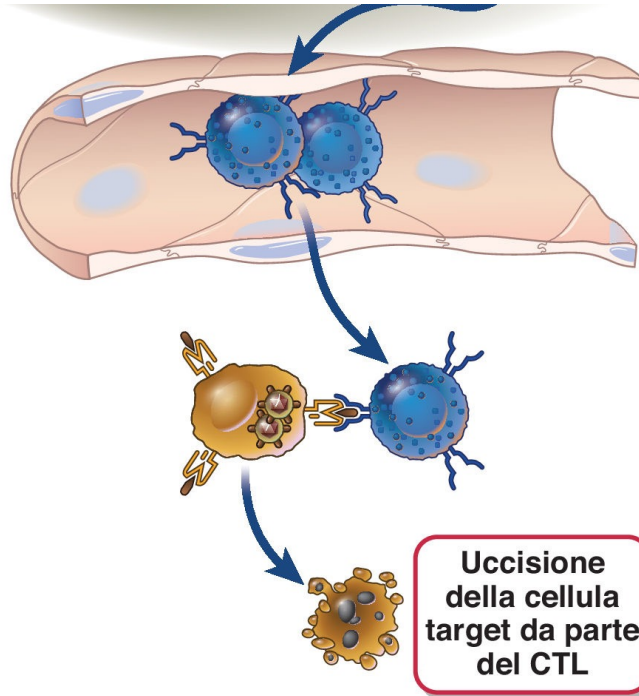
EGR2 = early growth response 2

I CTL migrano nel sito di infezione ...

I linfociti CTL CD8⁺
differenziati
entrano in circolo

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

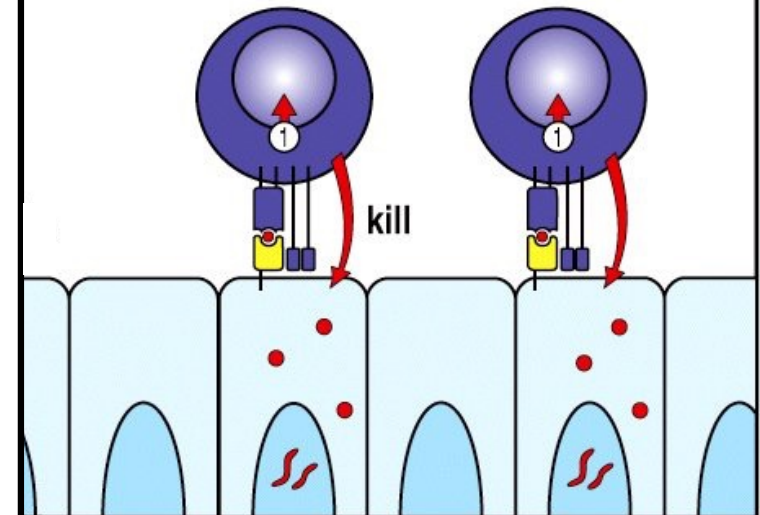
Funzioni effettrici
dei linfociti T



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

Sito di infezione

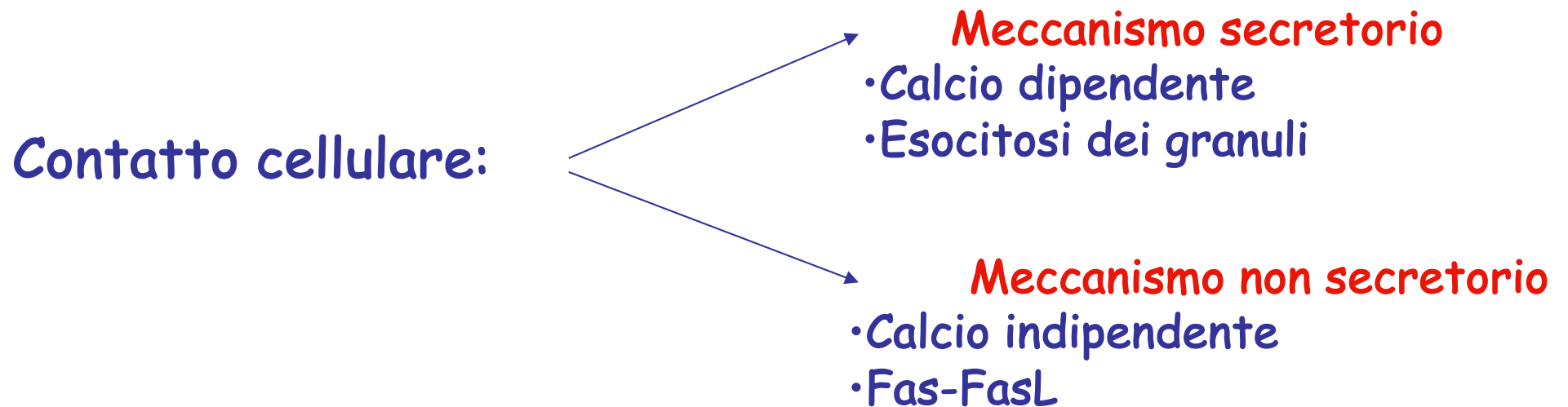
Active effector T cells kill
virus-infected target cells



EFFECTOR FUNCTION

MECCANISMI DI LISI MEDIATA DAI CTL

CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA:

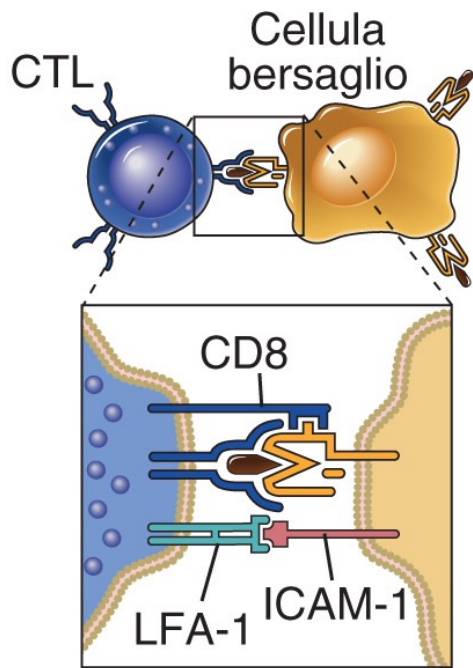


Secrezione di citochine: $IFN\gamma$ $TNF\ \alpha/\beta$

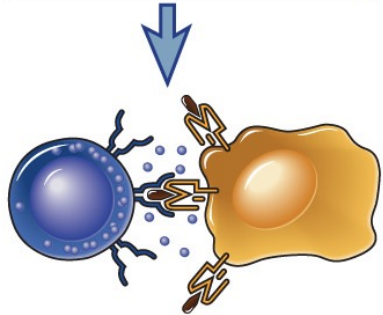
MORTE DELLA CELLULA BERSAGLIO

- Lisi osmotica
- Apoptosi

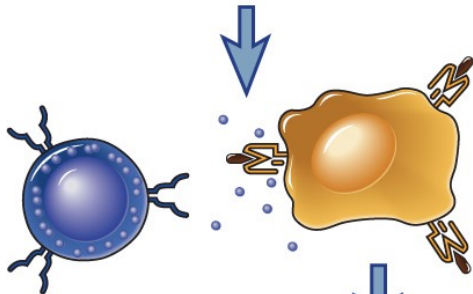
CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA CONTATTO CELLULARE: MECCANISMO SECRETORIO



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

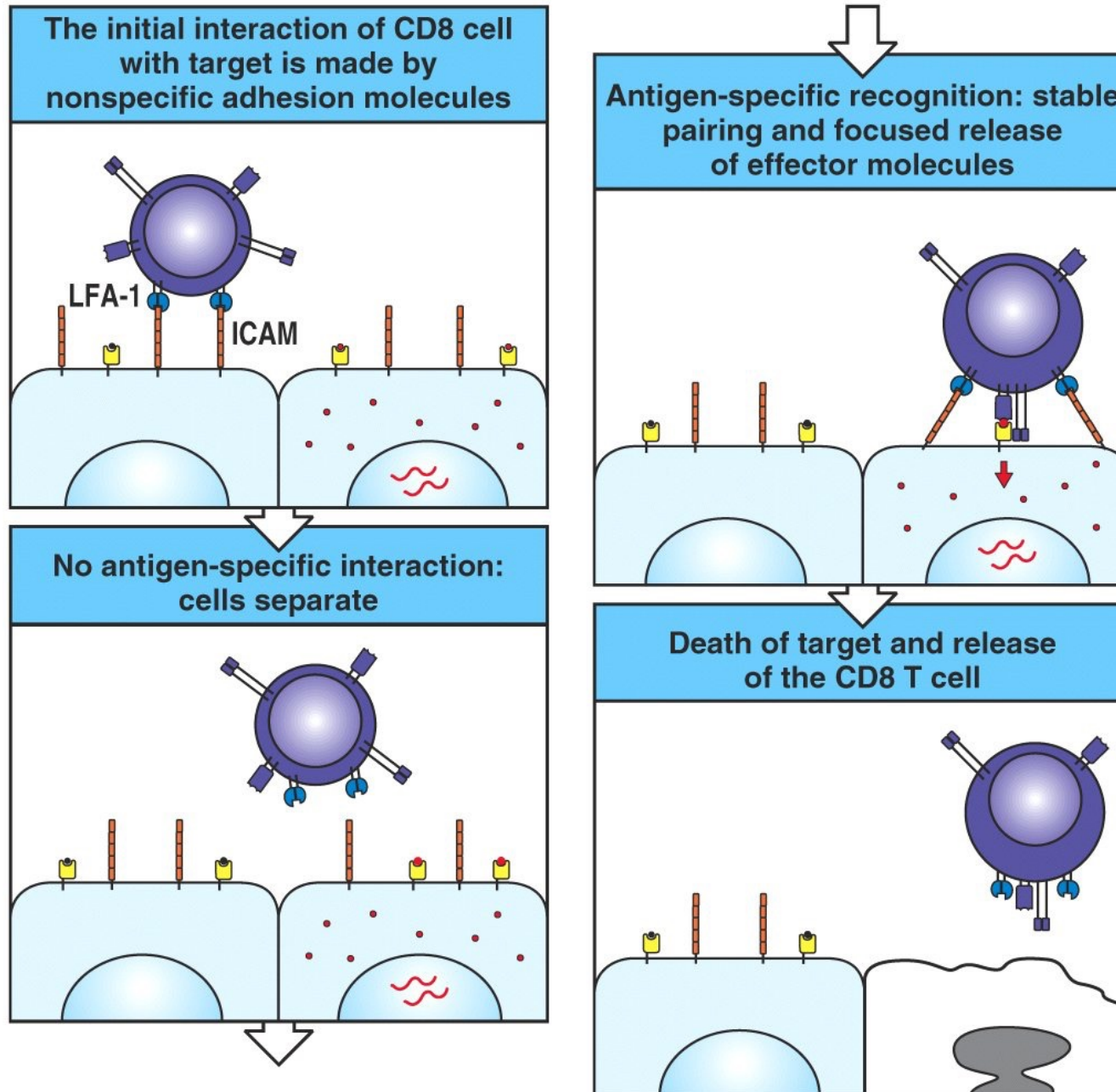
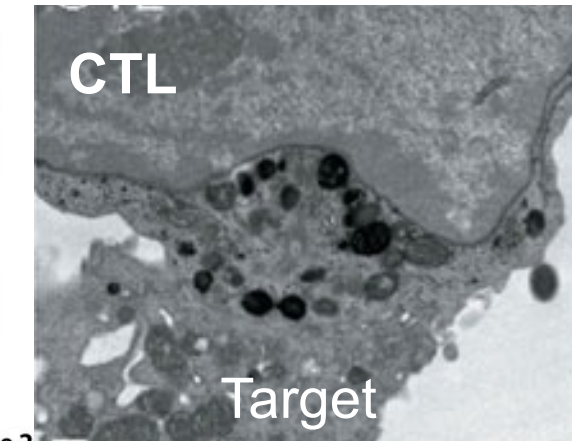
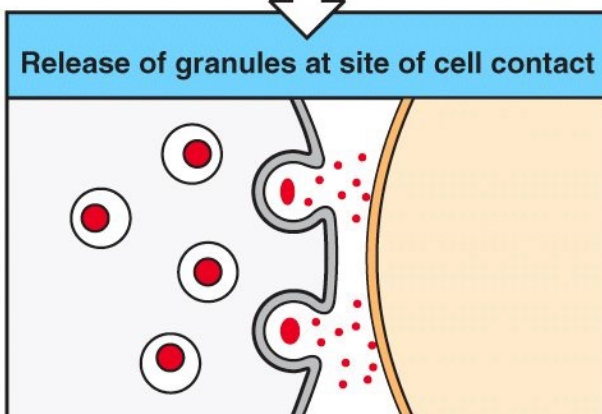
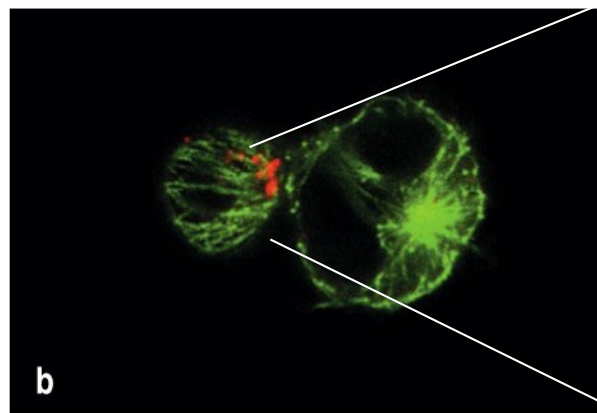
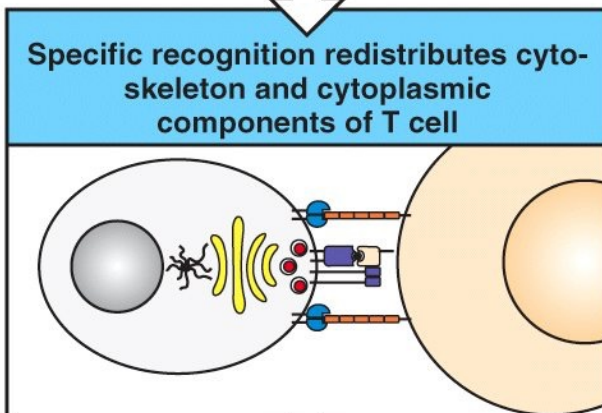
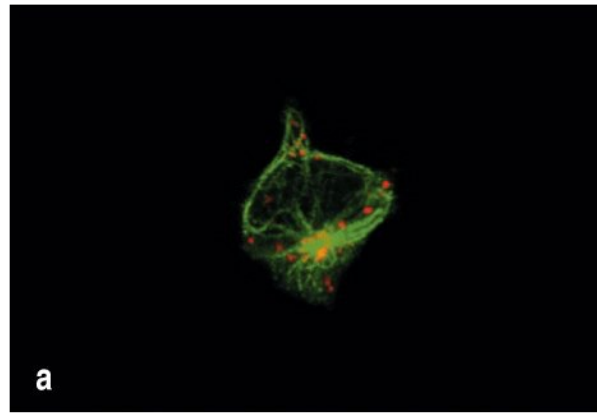
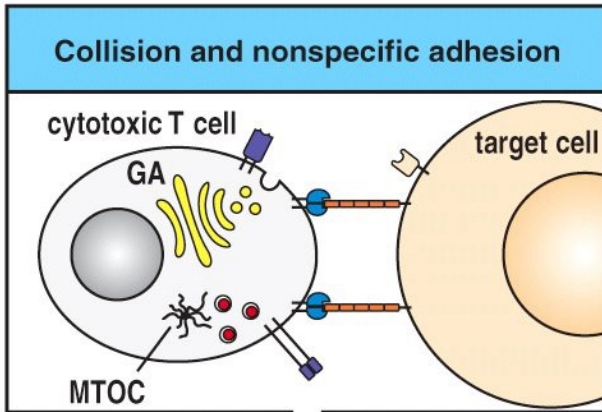


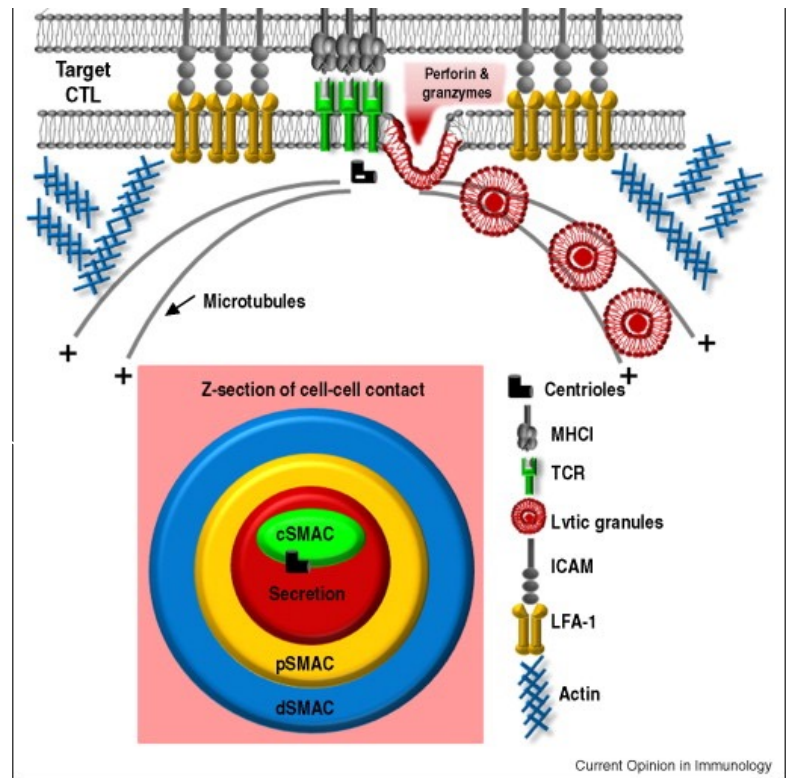
Figure 8-28 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

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

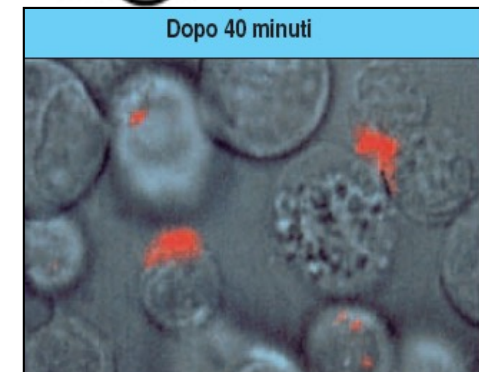
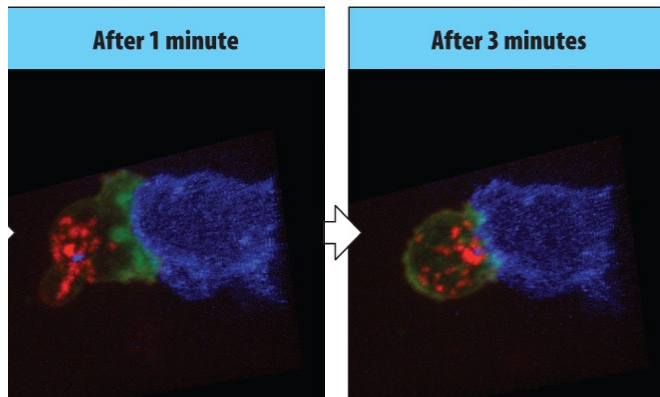
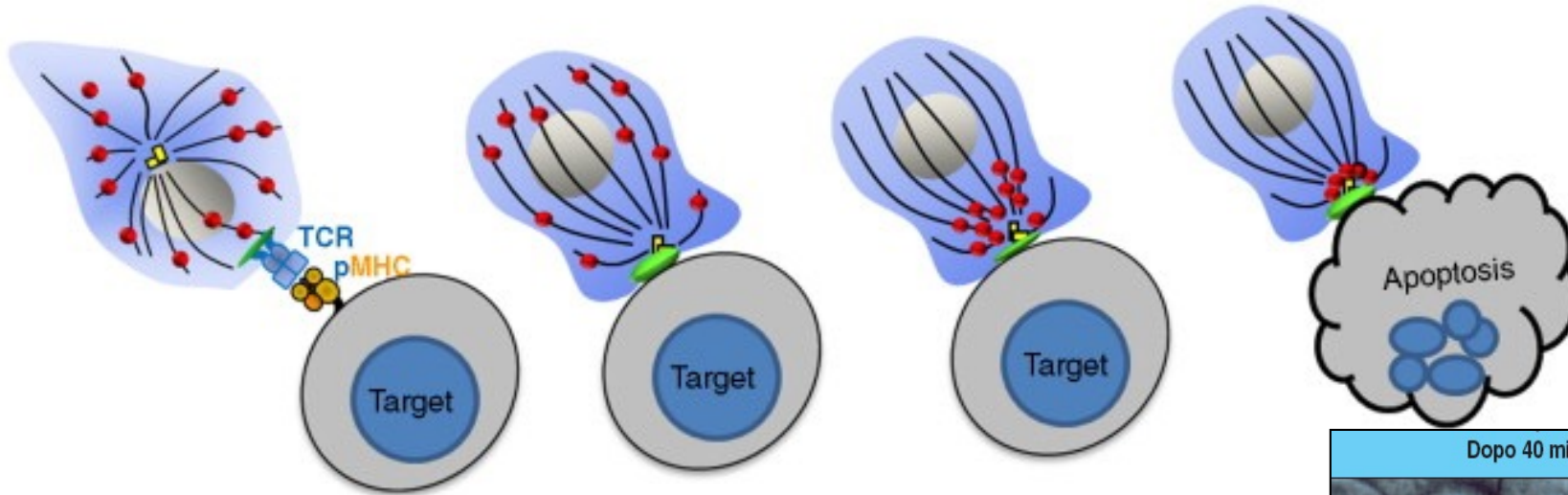
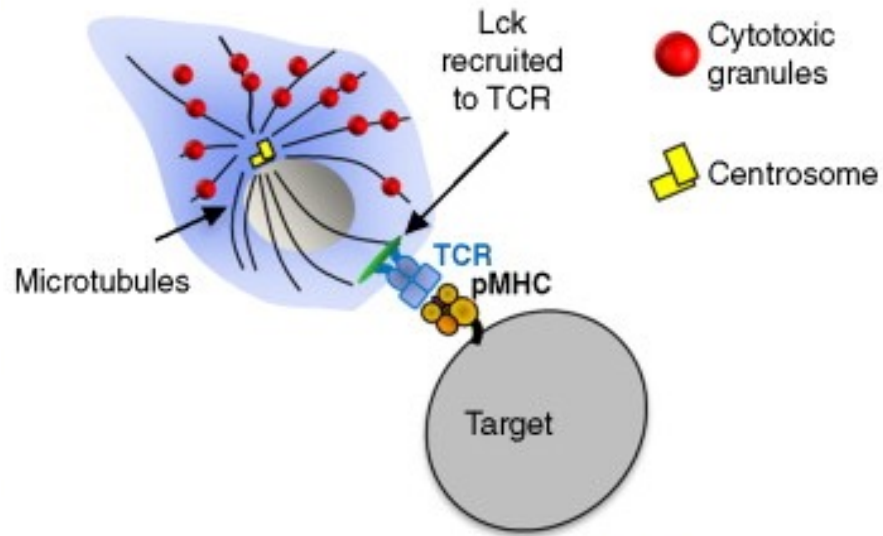


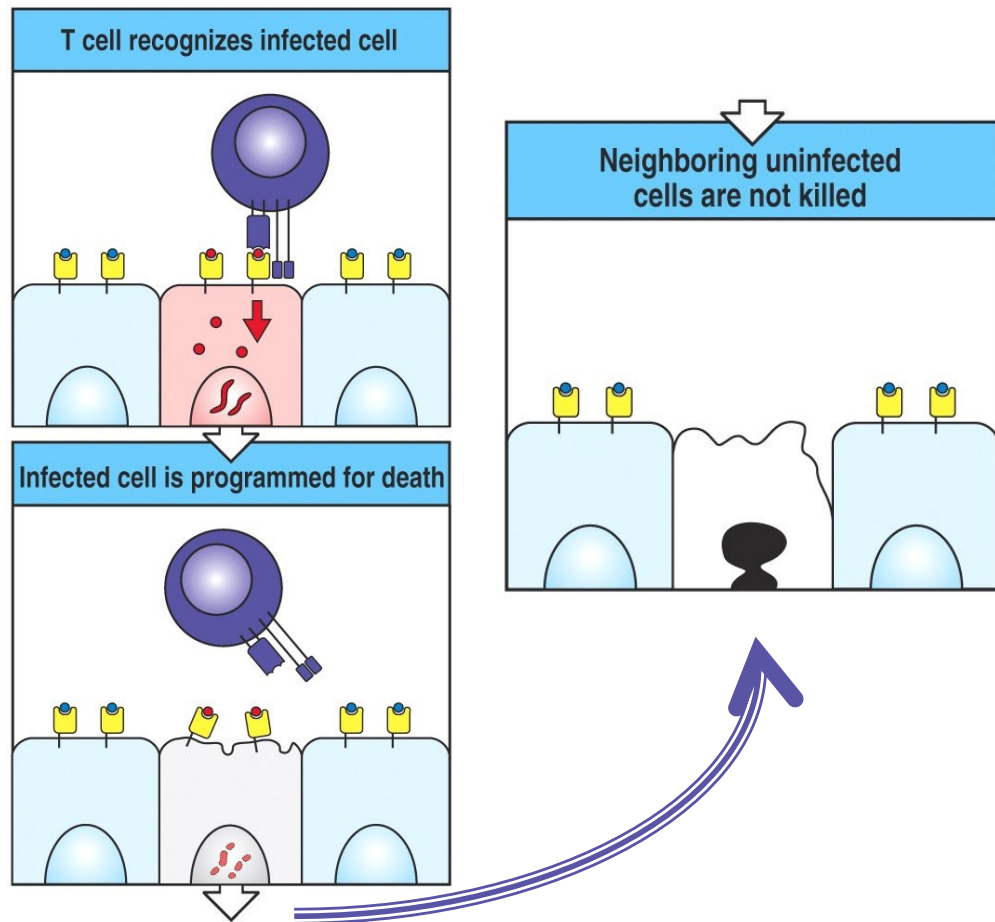
MTOC = centro di organizzazione dei microtubuli

La sinapsi citotossica



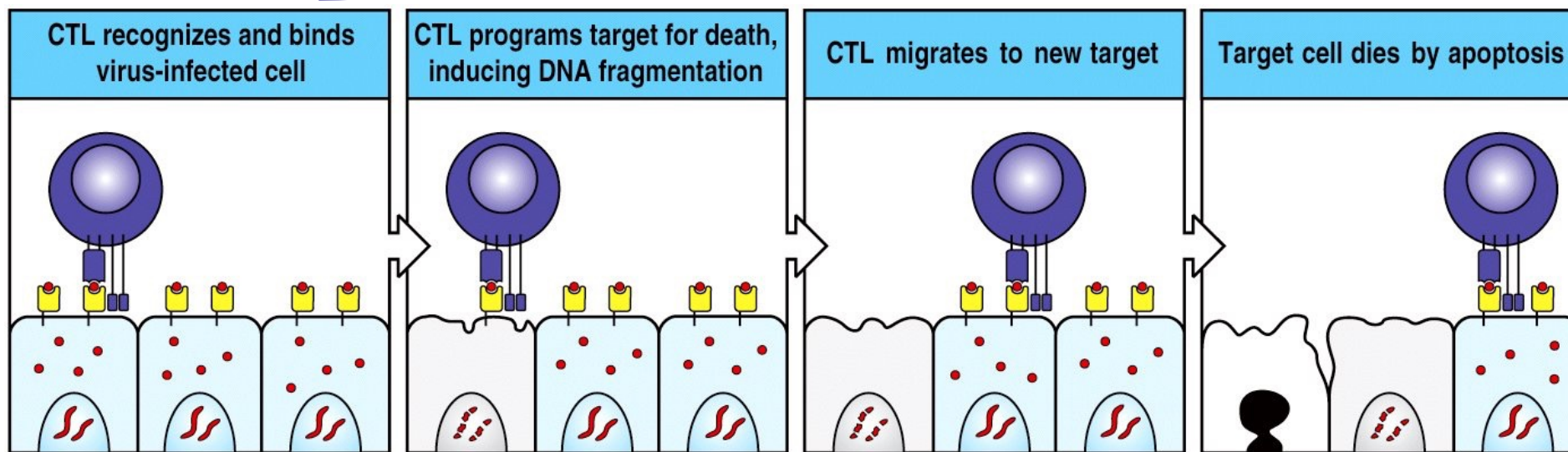
I granuli sono secreti in modo POLARIZZATO





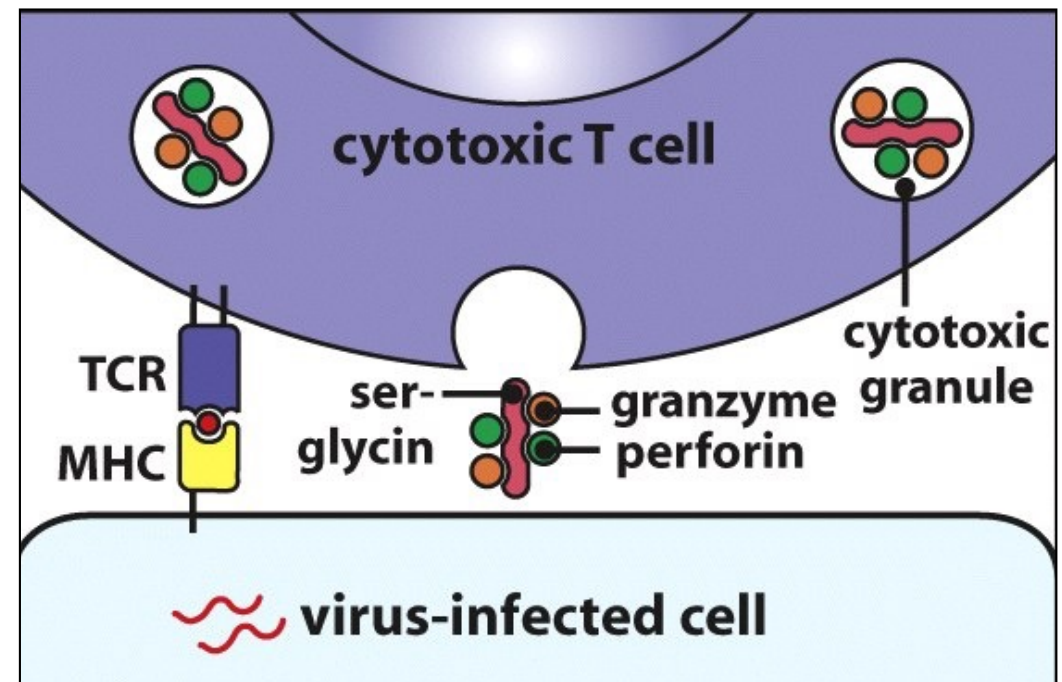
I CTL uccidono in maniera selettiva....

....e seriale

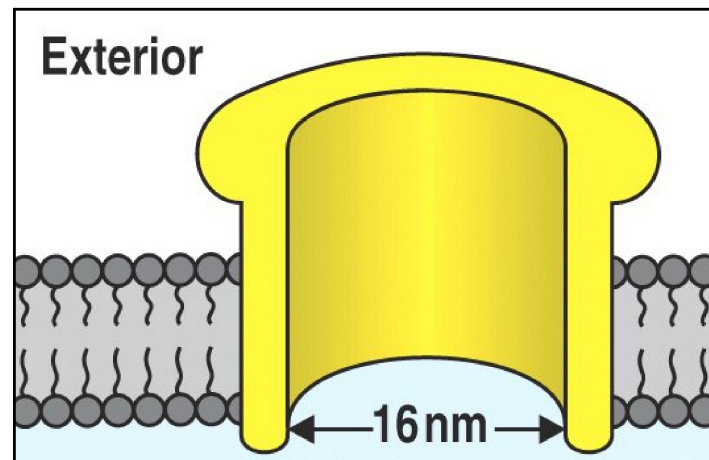
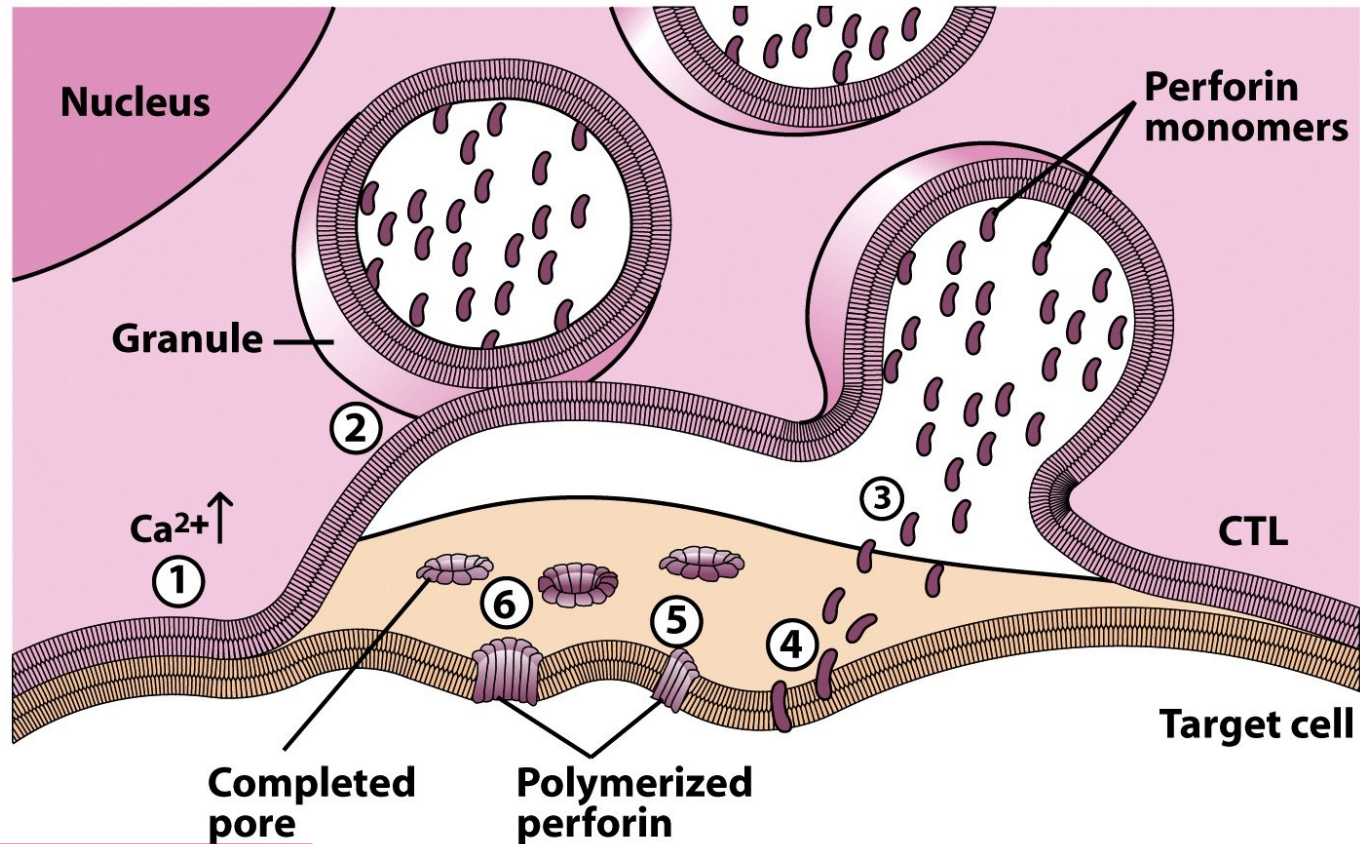


Cosa contengono i granuli citotossici?

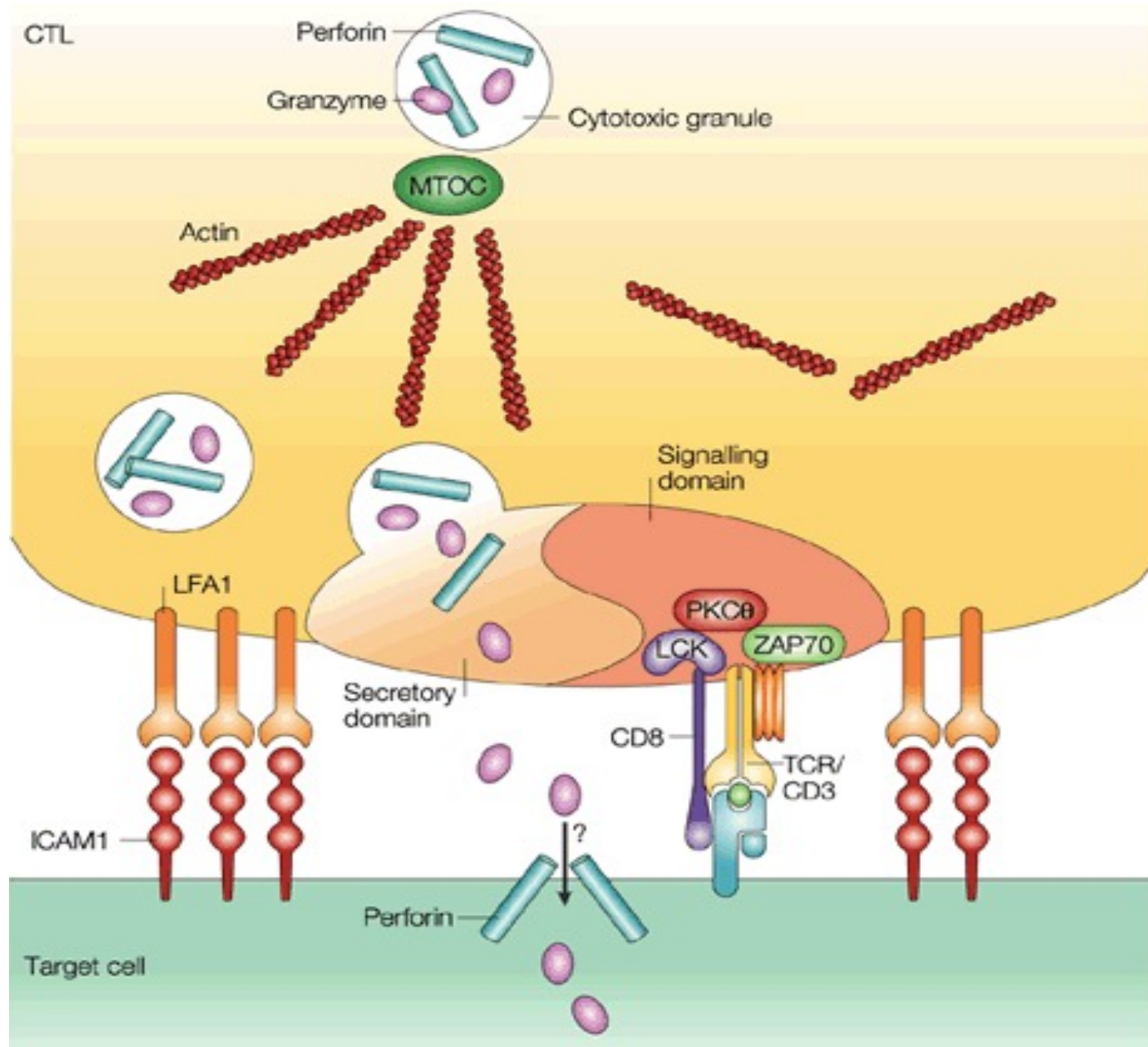
Protein in granules of cytotoxic T cells	Actions on target cells
Perforin	Aids in delivering contents of granules into the cytoplasm of target cell
Granzymes	Serine proteases, which activate apoptosis once in the cytoplasm of the target cell
Granulysin	Has antimicrobial actions and can induce apoptosis



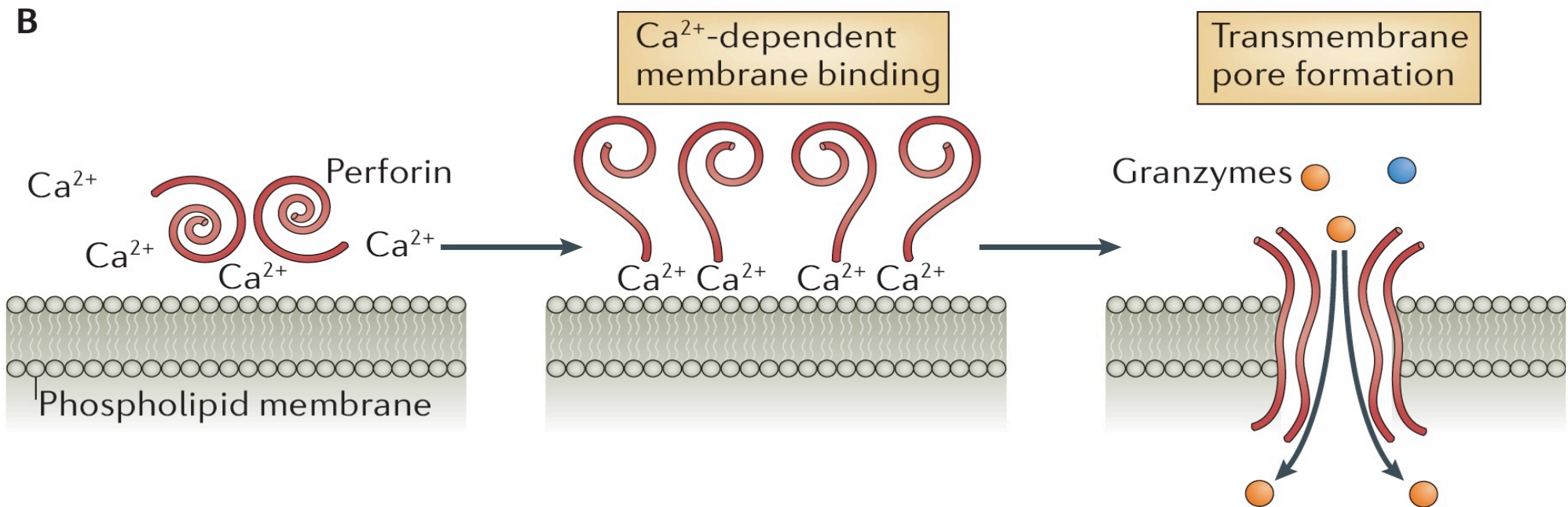
La polimerizzazione della perforina crea dei pori sulla membrana della cellula bersaglio



La perforina polimerizza al centro della sinapsi secretoria



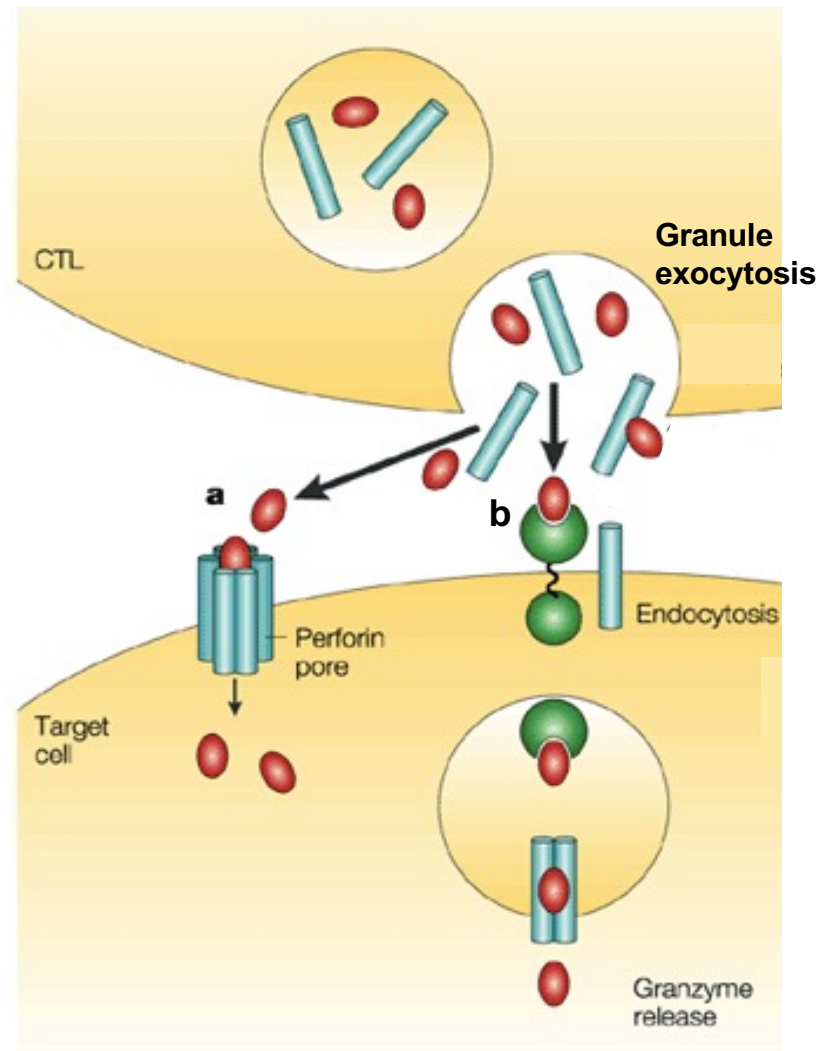
Model of perforin and granzyme synergy in target-cell death



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

Modelli di ingresso dei Granzimi nella cellula bersaglio

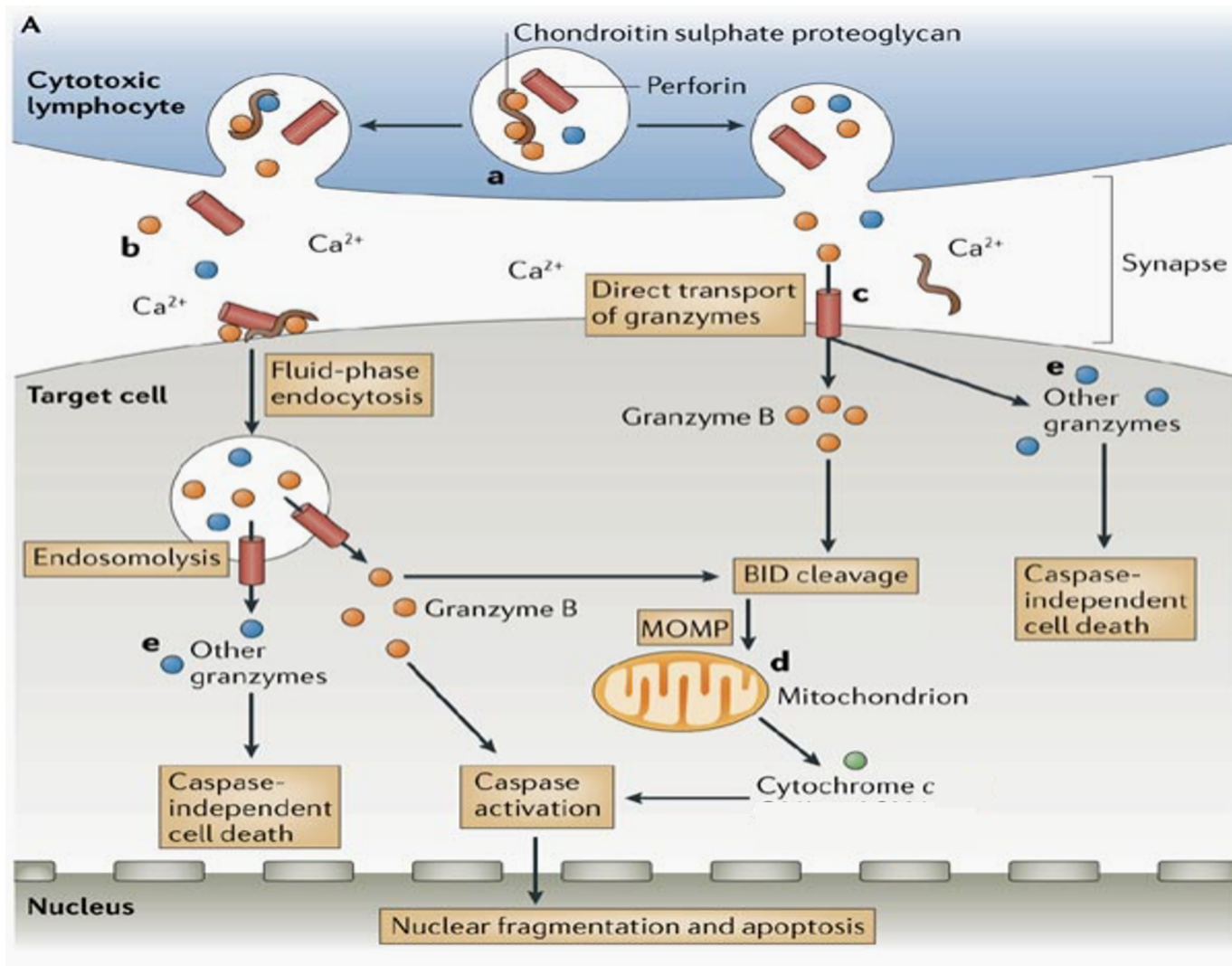
La perforina consente la diffusione dei granzimi nel citoplasma della cellula bersaglio creando dei pori sulla sua membrana plasmatica



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

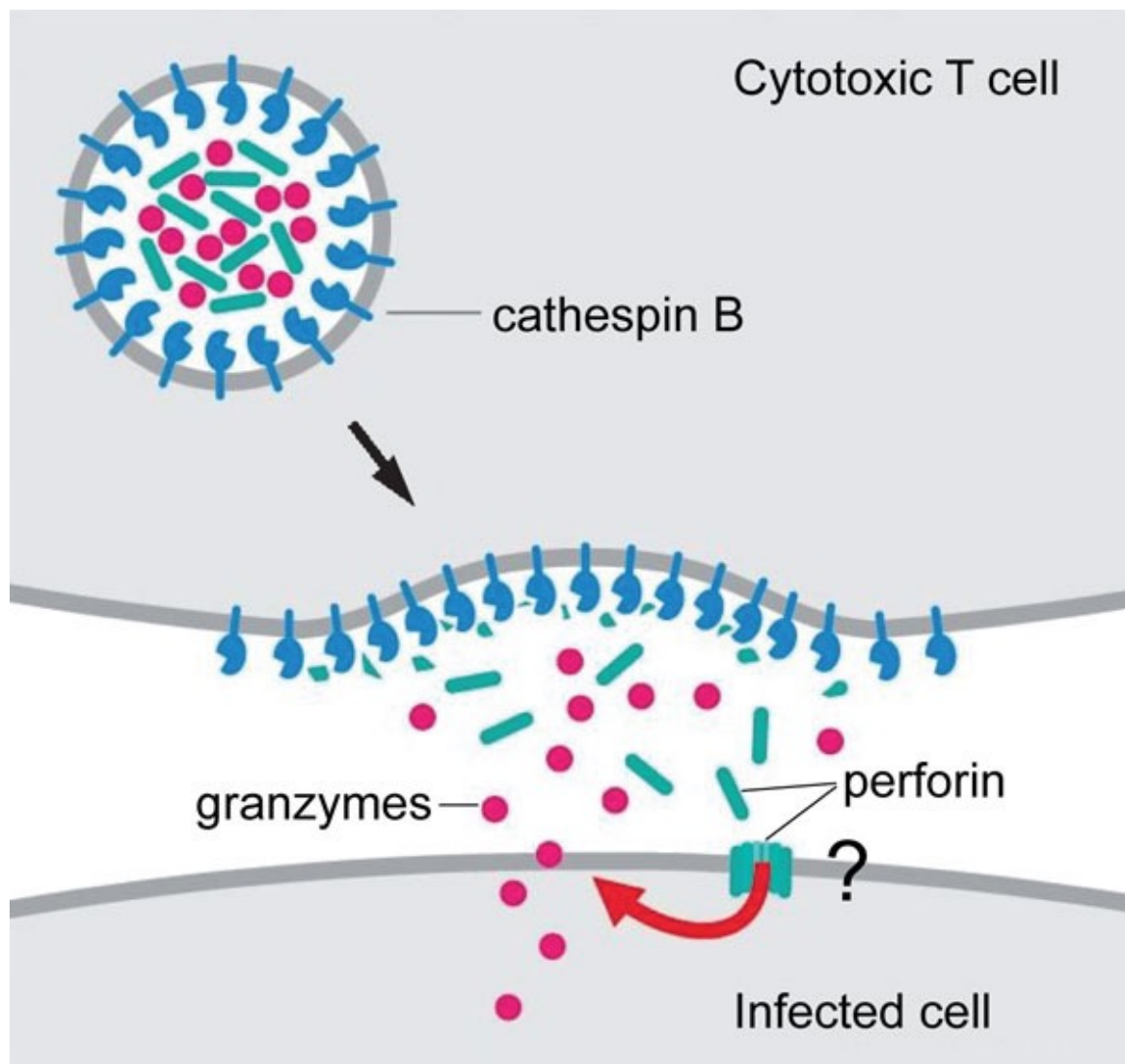


Perforina induce i pori!!

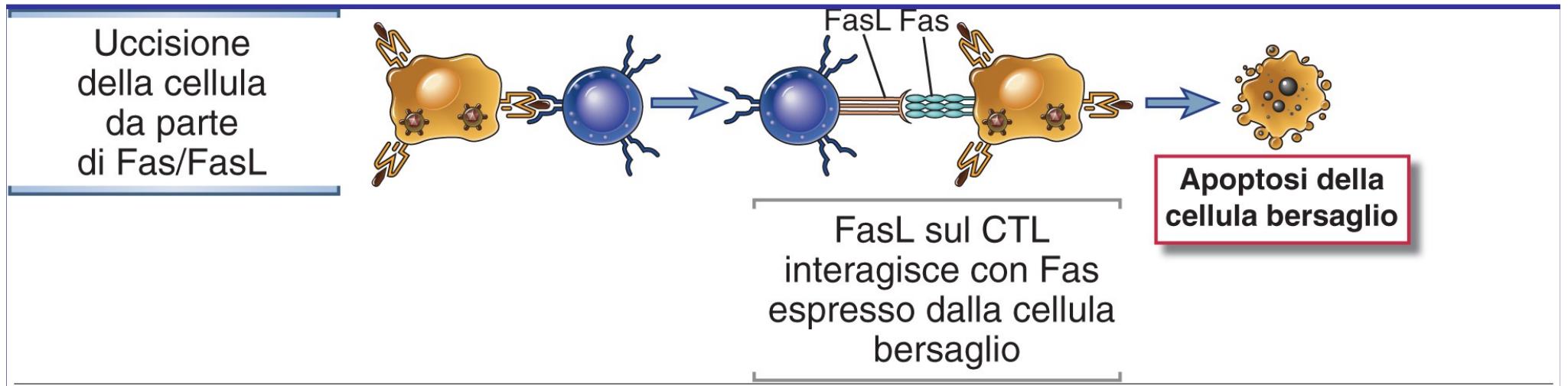
Granzyme B attiva le caspasi e induce morte apoptotica!!!

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

Perché il CTL non viene ucciso?



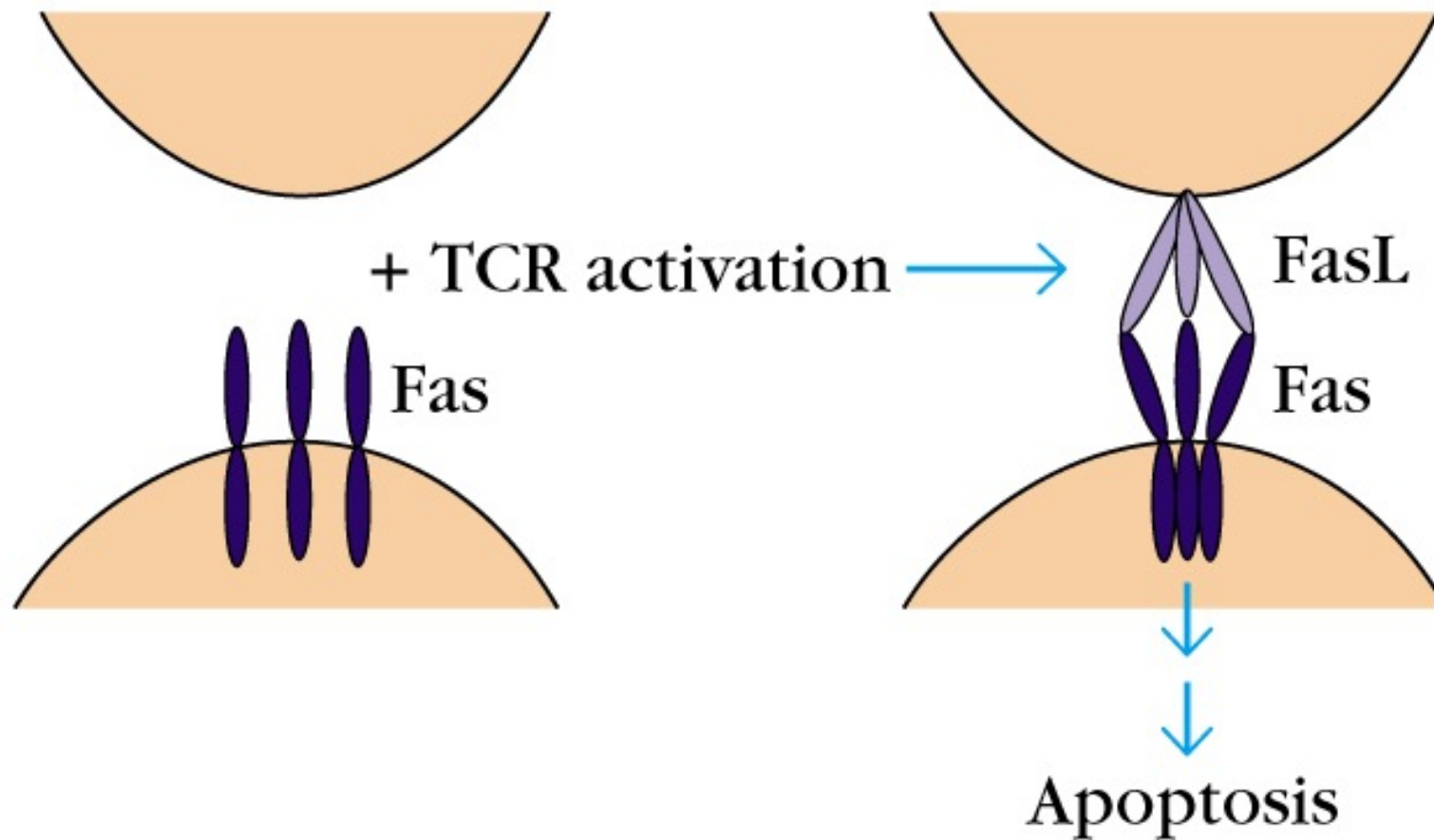
CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA CONTATTO CELLULARE: **MECCANISMO NON SECRETORIO**



FAS/FASL interaction triggers apoptosis

FAS ligand (FASL):

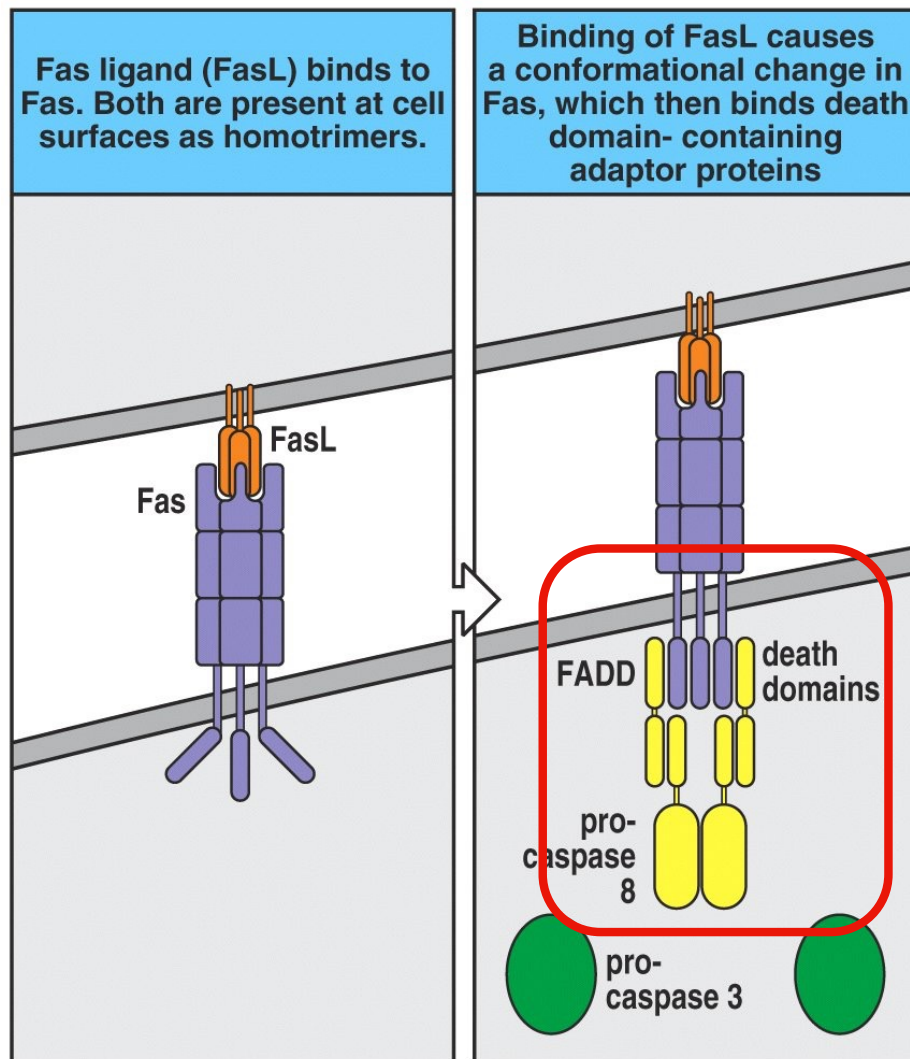
- a type II transmembrane protein, expressed on activated T (CD8, Th1) and NK cells
- induced by activation (antigen recognition), and rapidly shed from cell surface (function of soluble form?)



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

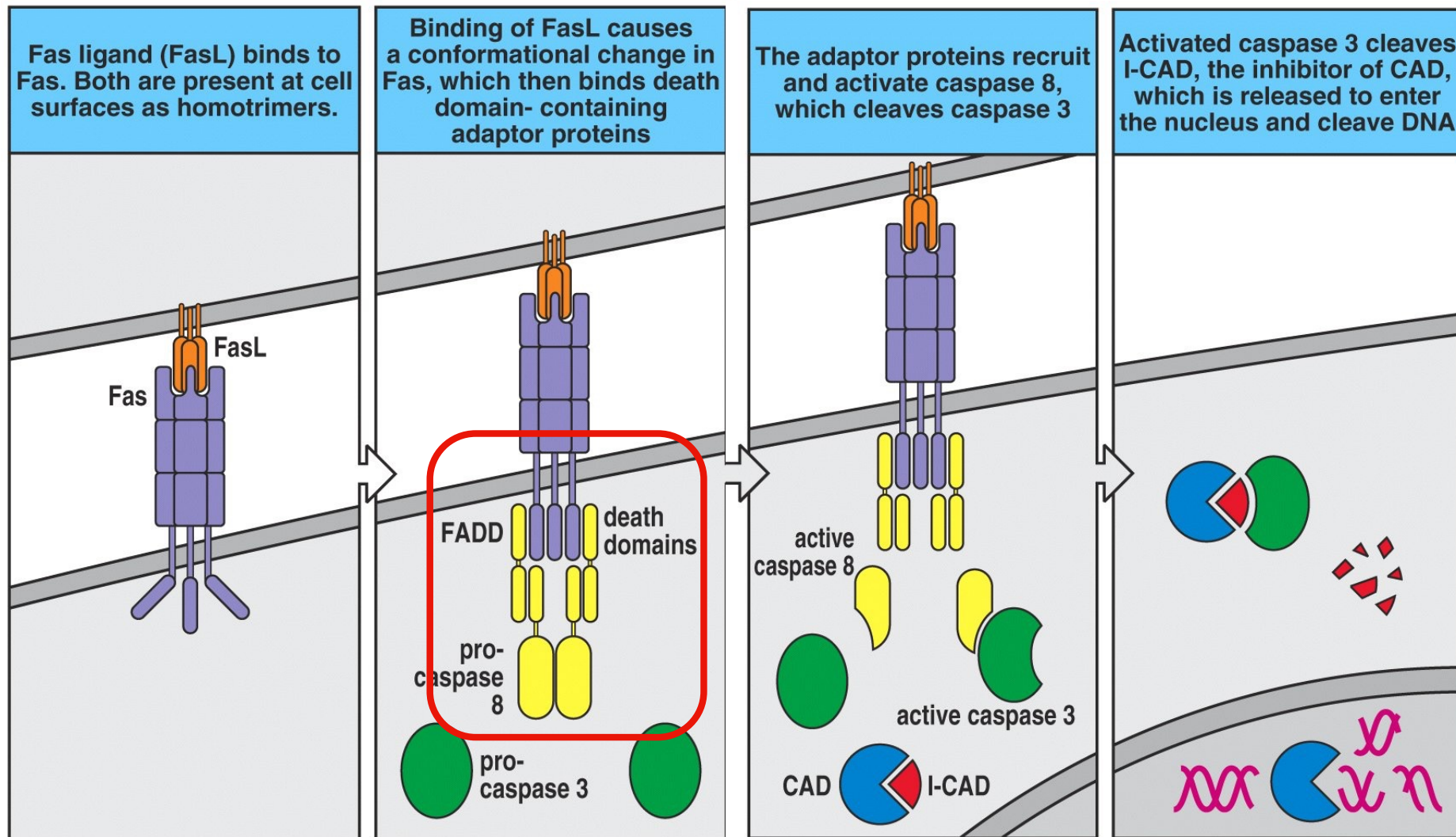


Figure 6-24 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

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

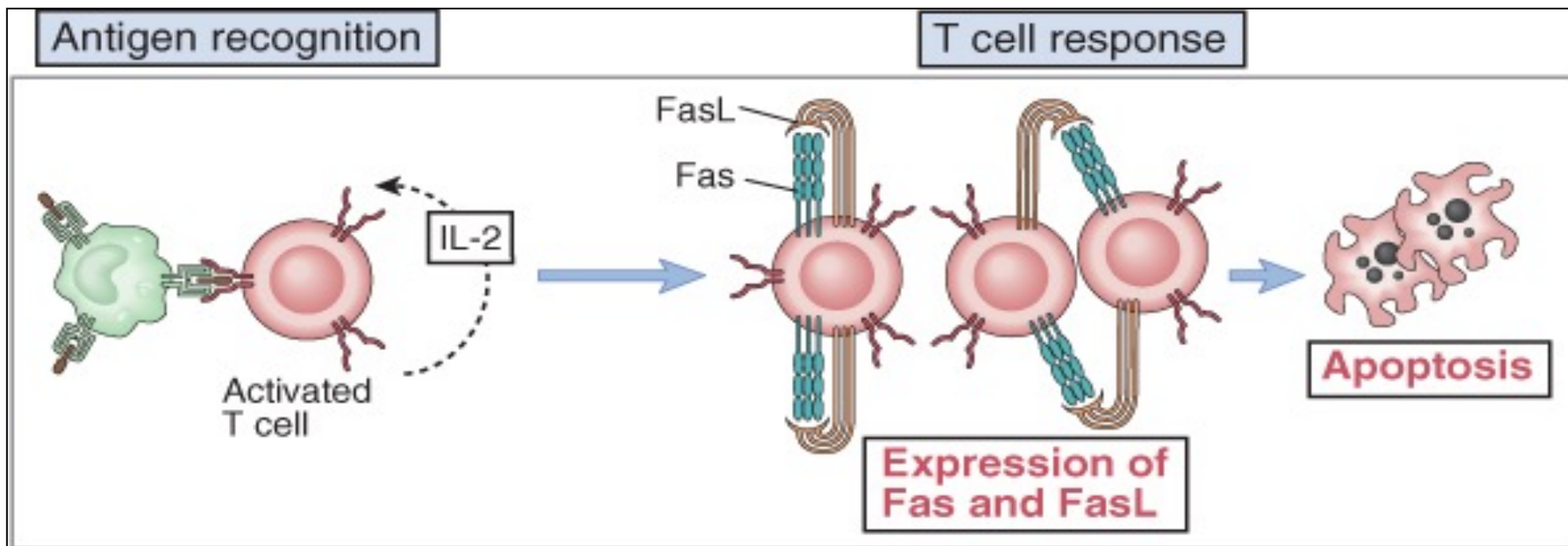
(CAD= caspase activable DNase)

CITOTOSSICITA' MEDIATA DA FAS:

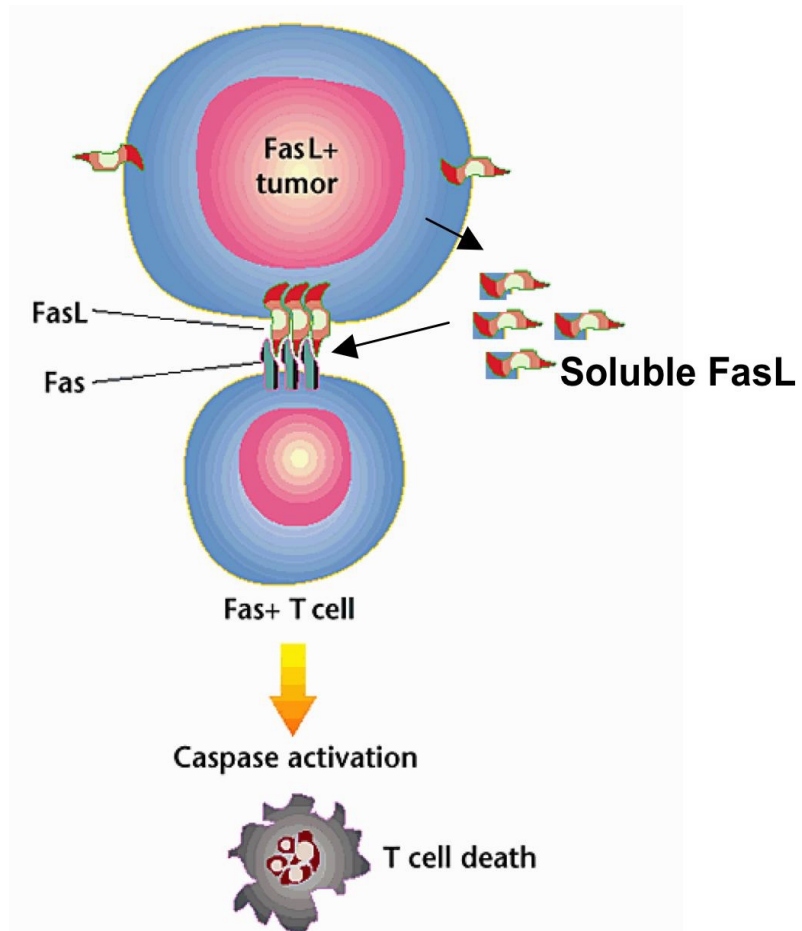
- Meccanismo di regolazione delle risposte immunitarie
- Meccanismo utilizzato dai tumori per evadere la sorveglianza immunologica
- Meccanismo di difesa degli organi immunologicamente privilegiati

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

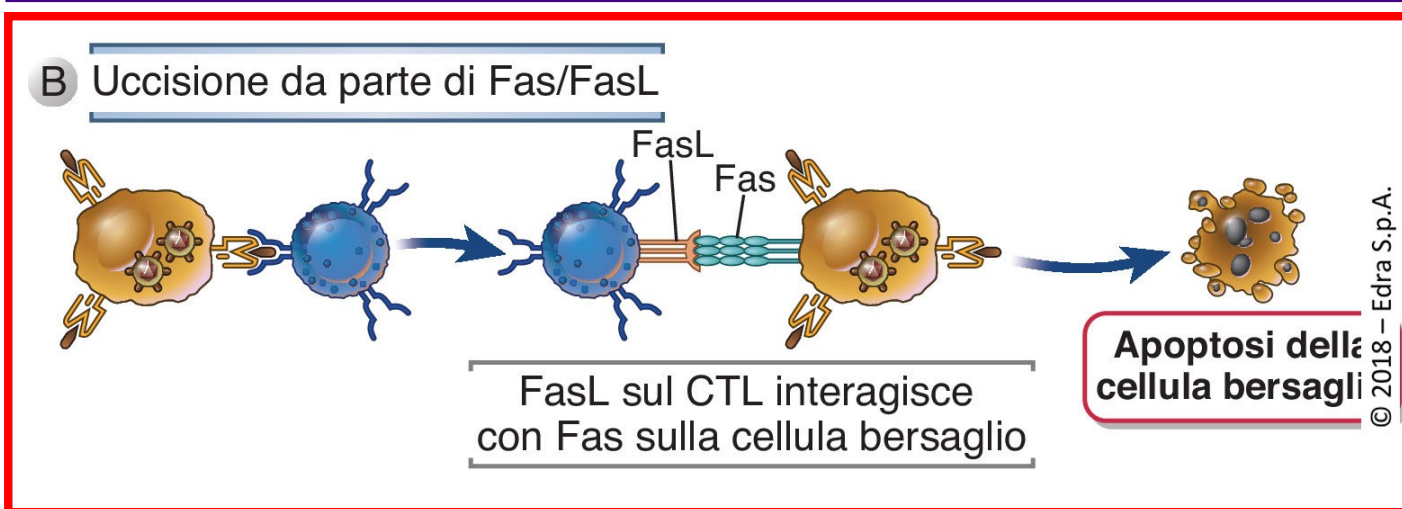
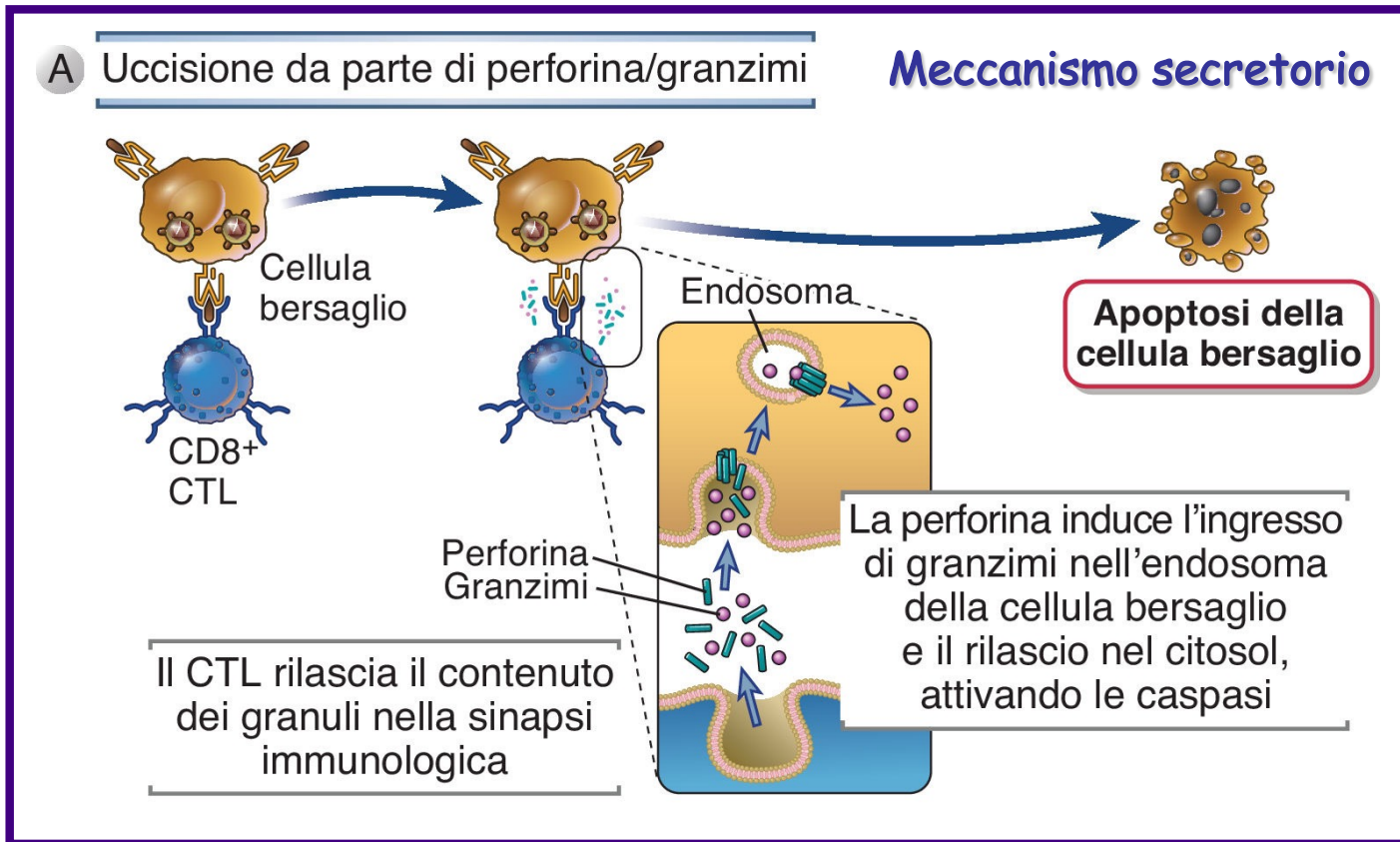


Le cellule degli “organi immunologicamente privilegiati” esprimono il ligando di Fas

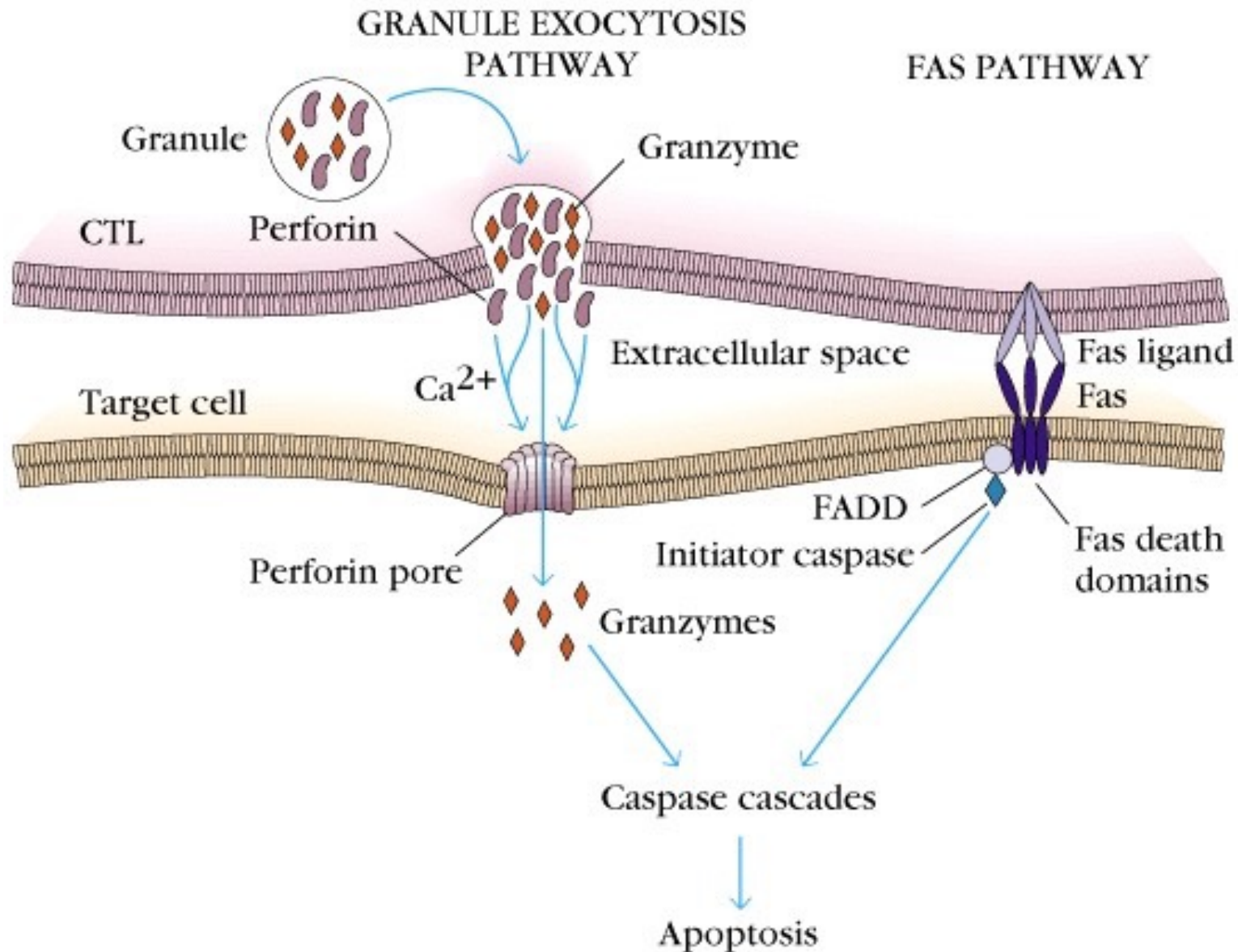
Immunologically privileged sites
Brain
Eye
Testis
Uterus (fetus)
Hamster cheek pouch

Figure 13-12 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

I due principali meccanismi litici dei CTL



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

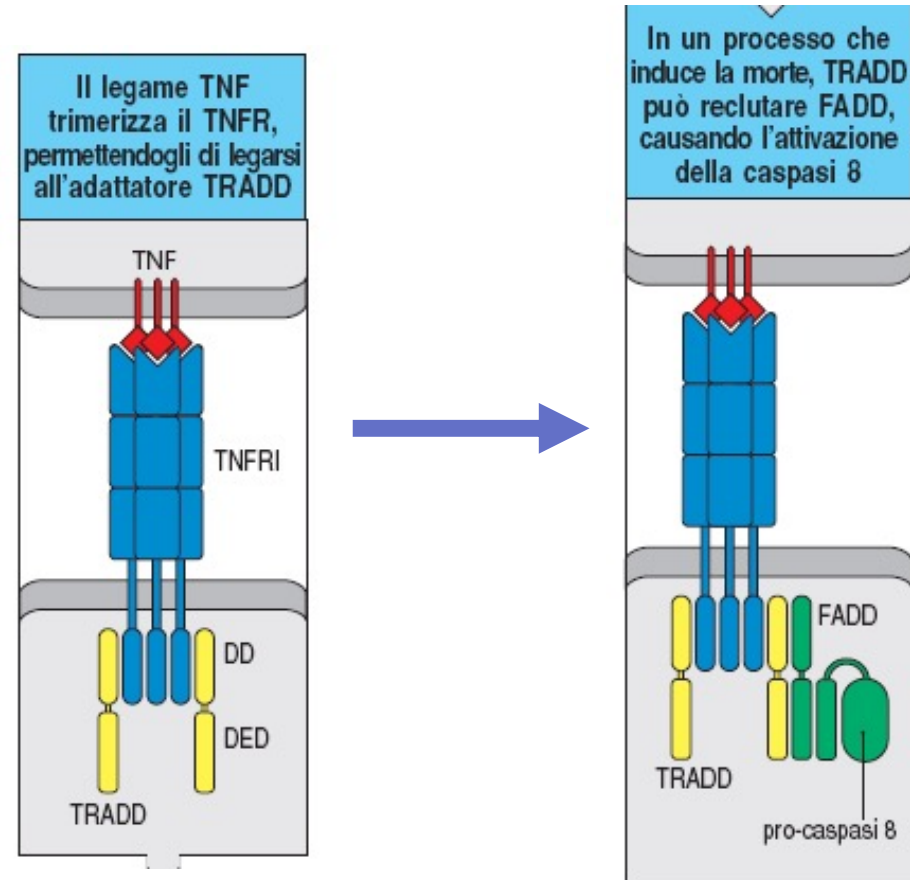
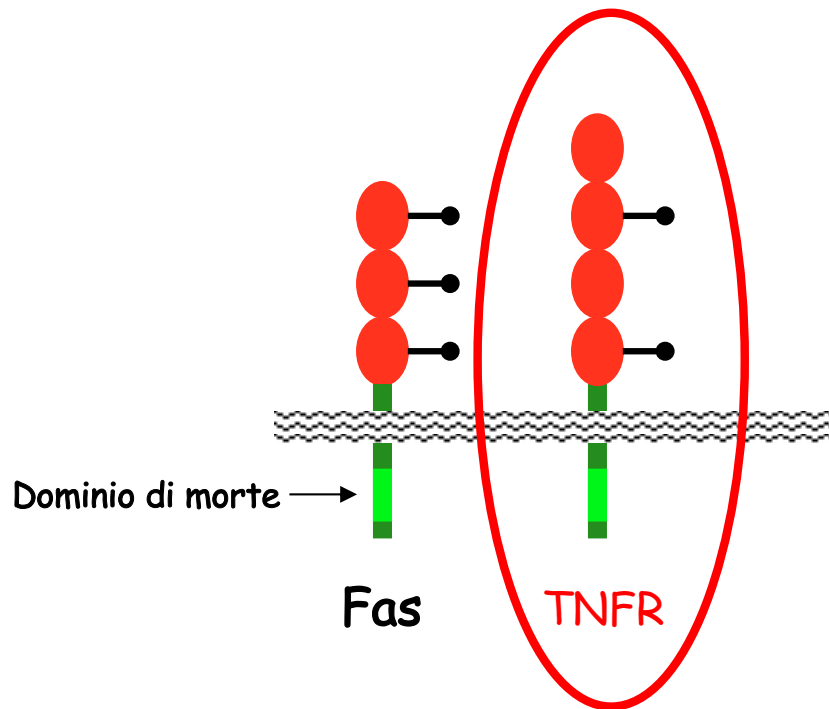


I CTL producono anche CITOCHINE citotossiche

Tumor Necrosis Factor =

TNF α e TNF β

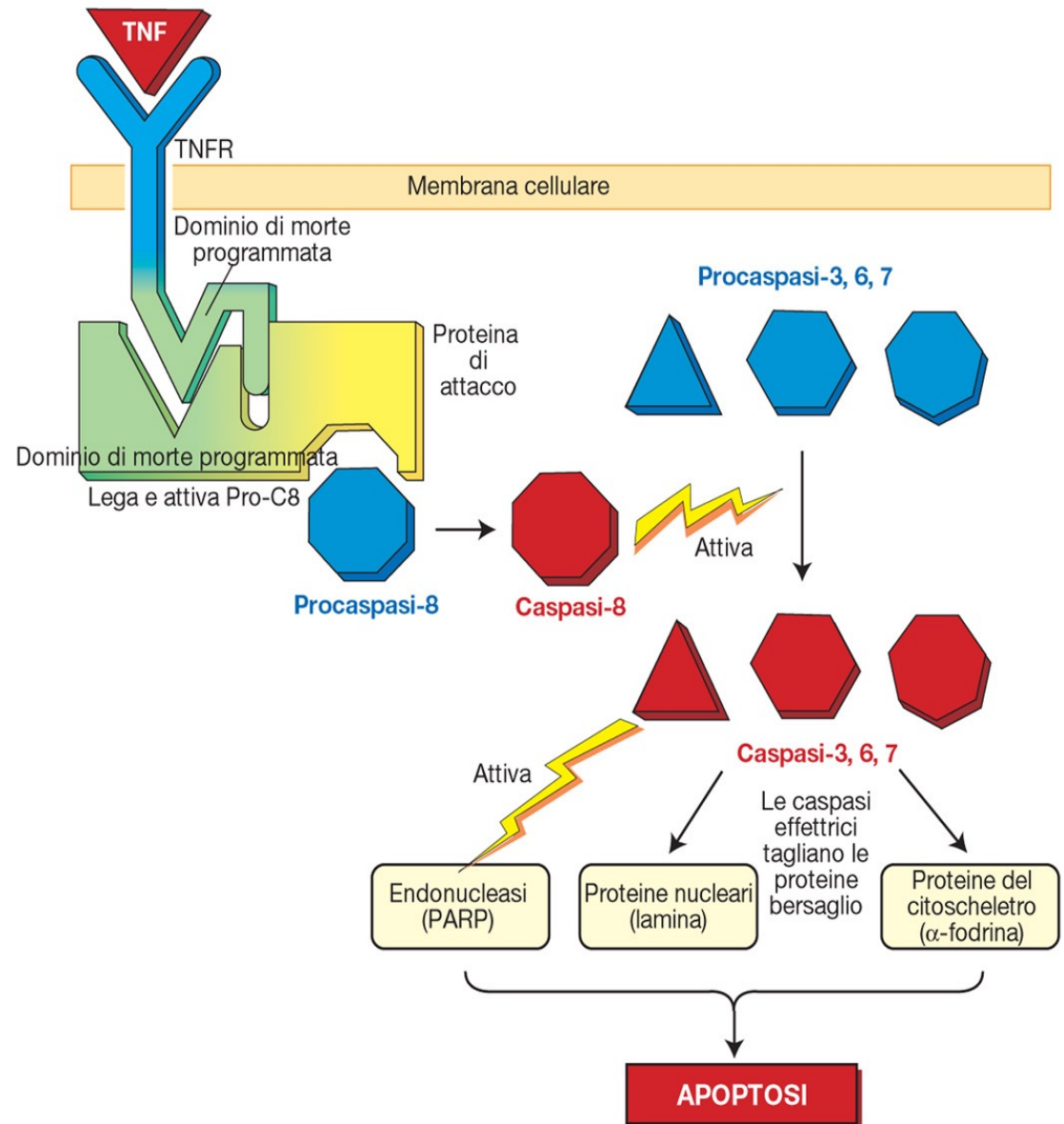
Esse inducono apoptosi dopo aver legato il loro recettore = TNFR



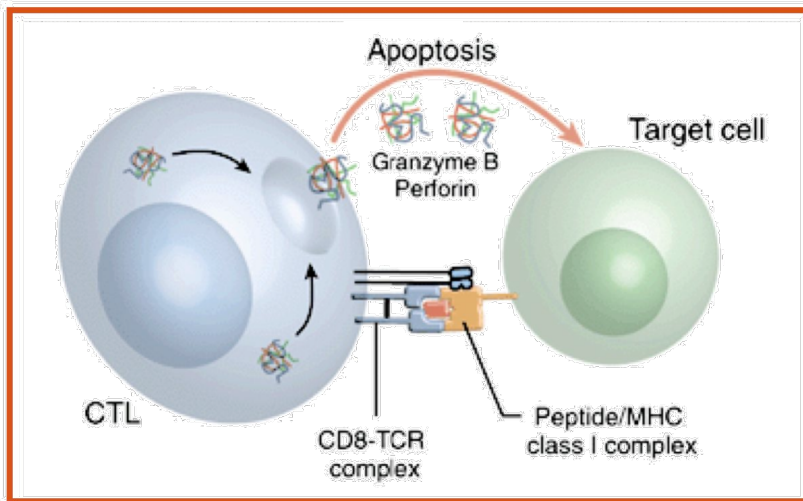
Il TNF induce morte per apoptosi della cellula bersaglio

Tumor **N**ecrosis **F**actor =
TNF

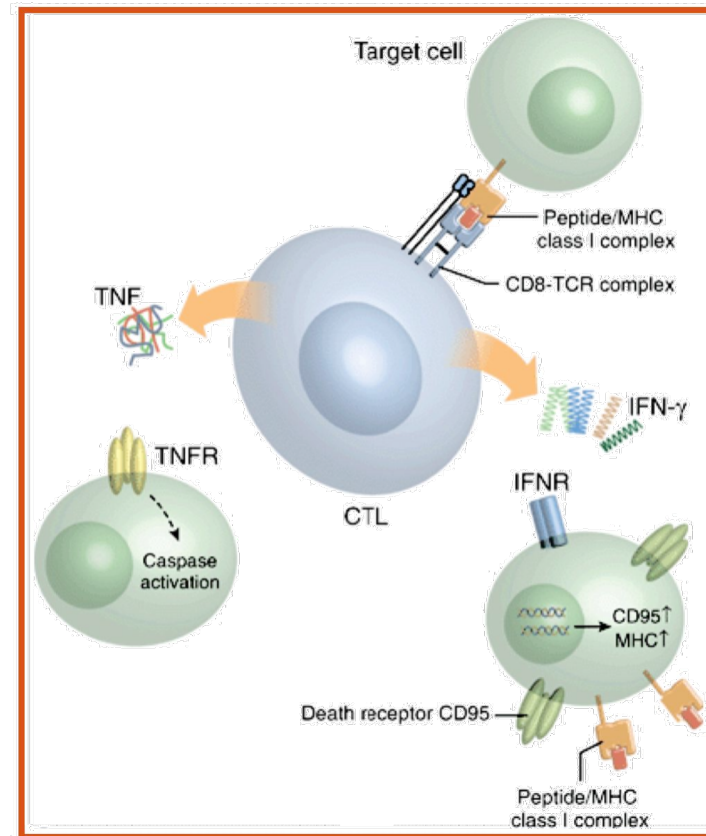
Induce apoptosi dopo aver
legato il suo recettore = TNFR



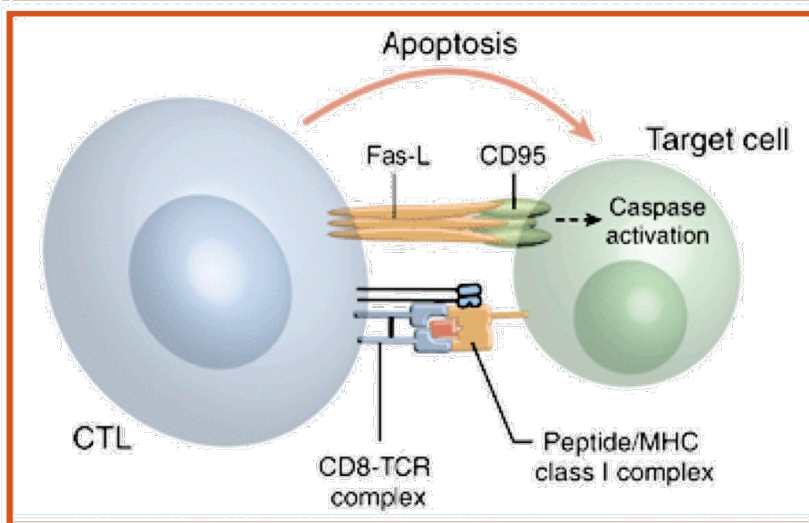
Citotossicità mediata dai linfociti CTL



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

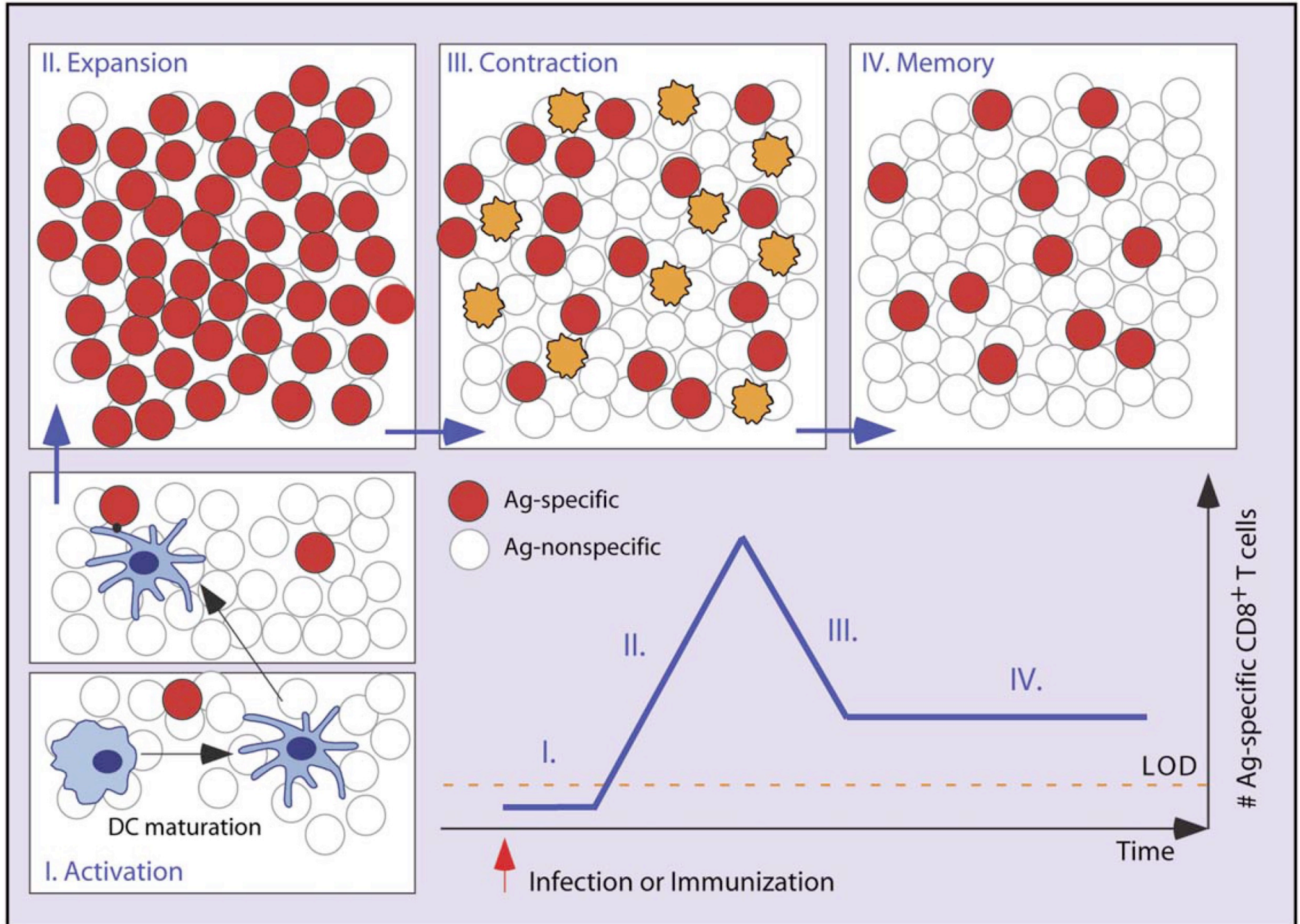


Indirect killing of target cells by release of Tumor Necrosis Factor-alpha and IFN-gamma

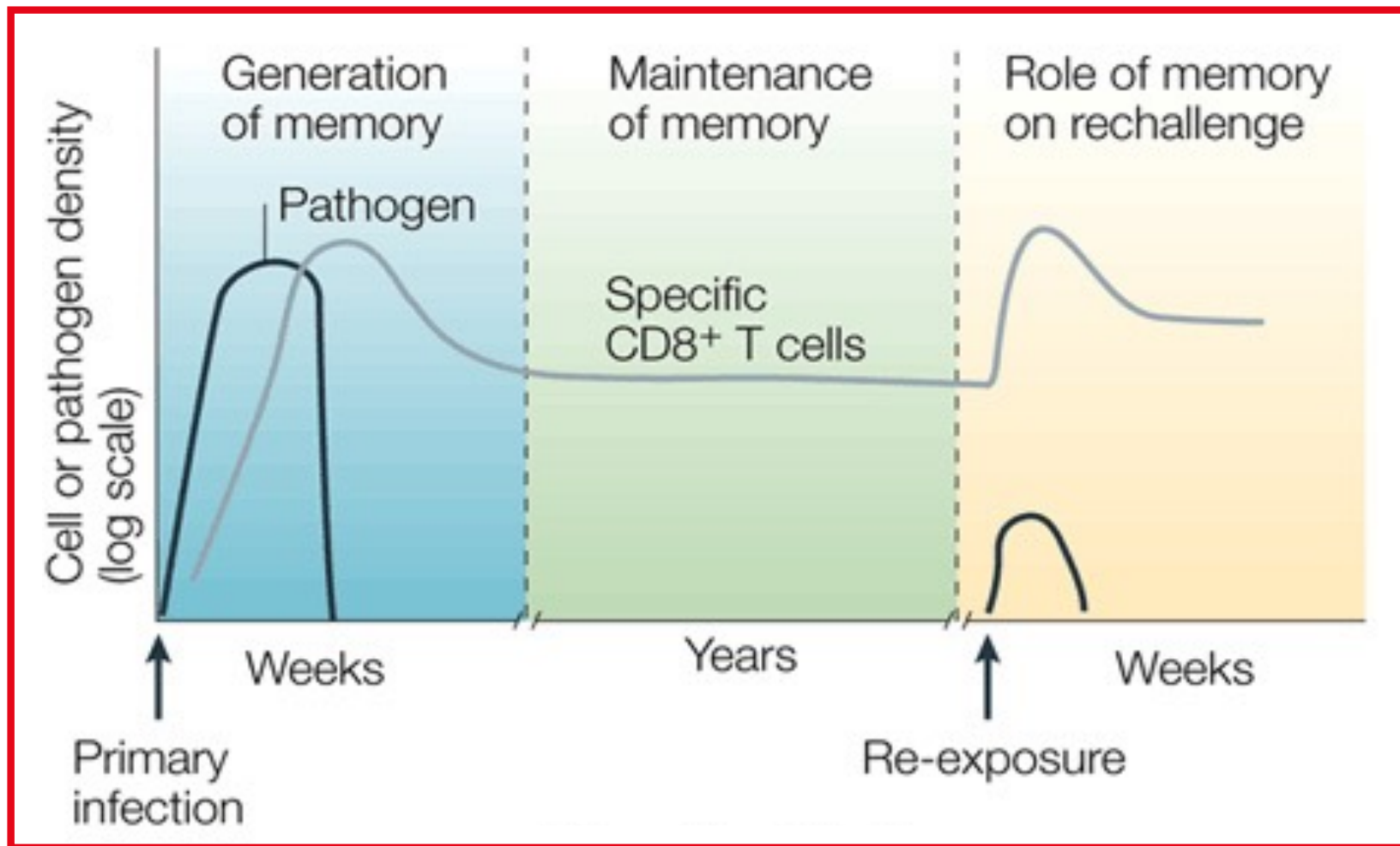


Induction of apoptosis in target cells via death receptor triggering

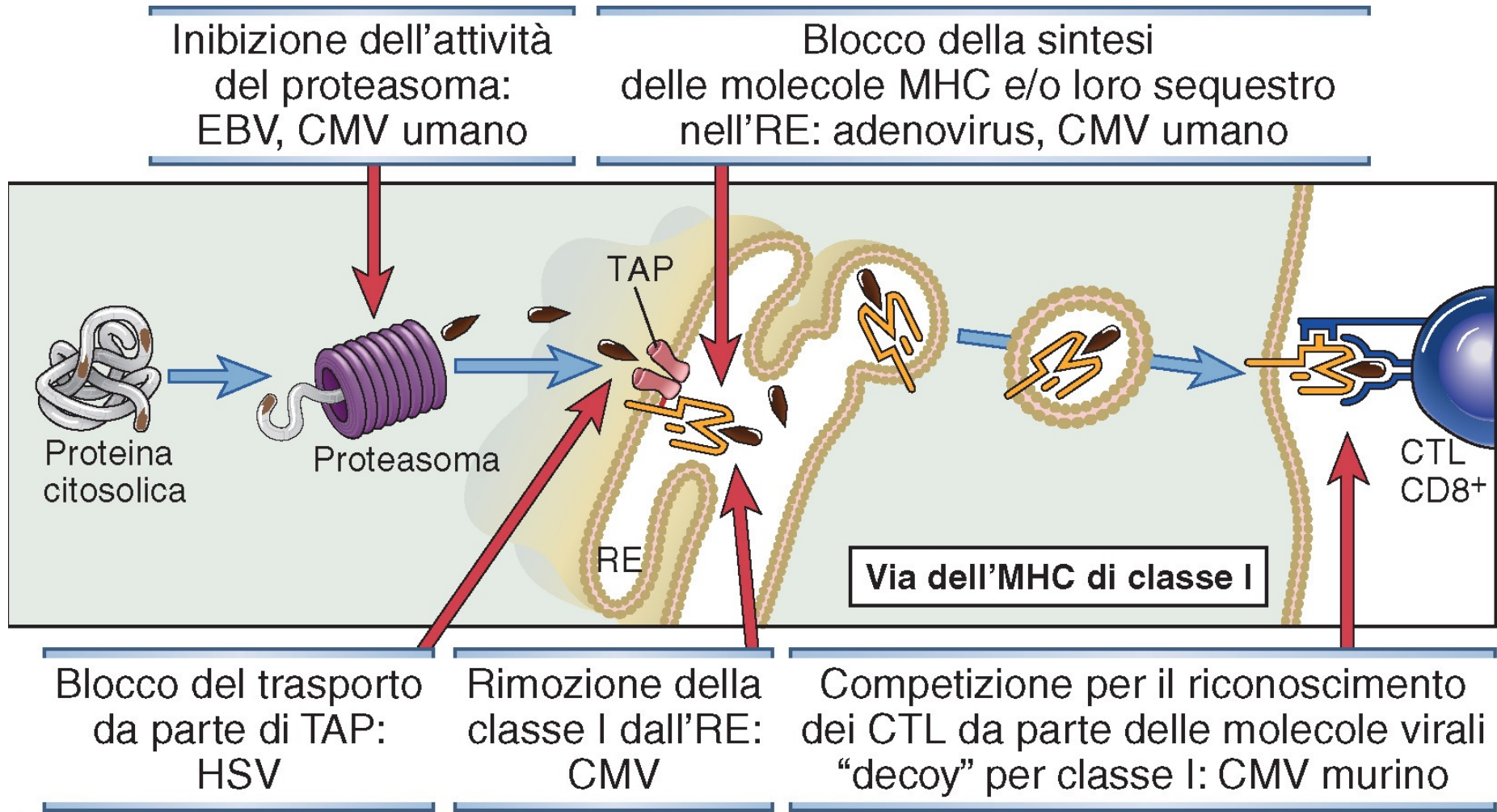
Naive-to-memory progression after acute infection



Attivazione dei CTL della memoria



Meccanismi utilizzati dai virus per inibire la risposta dei CTL

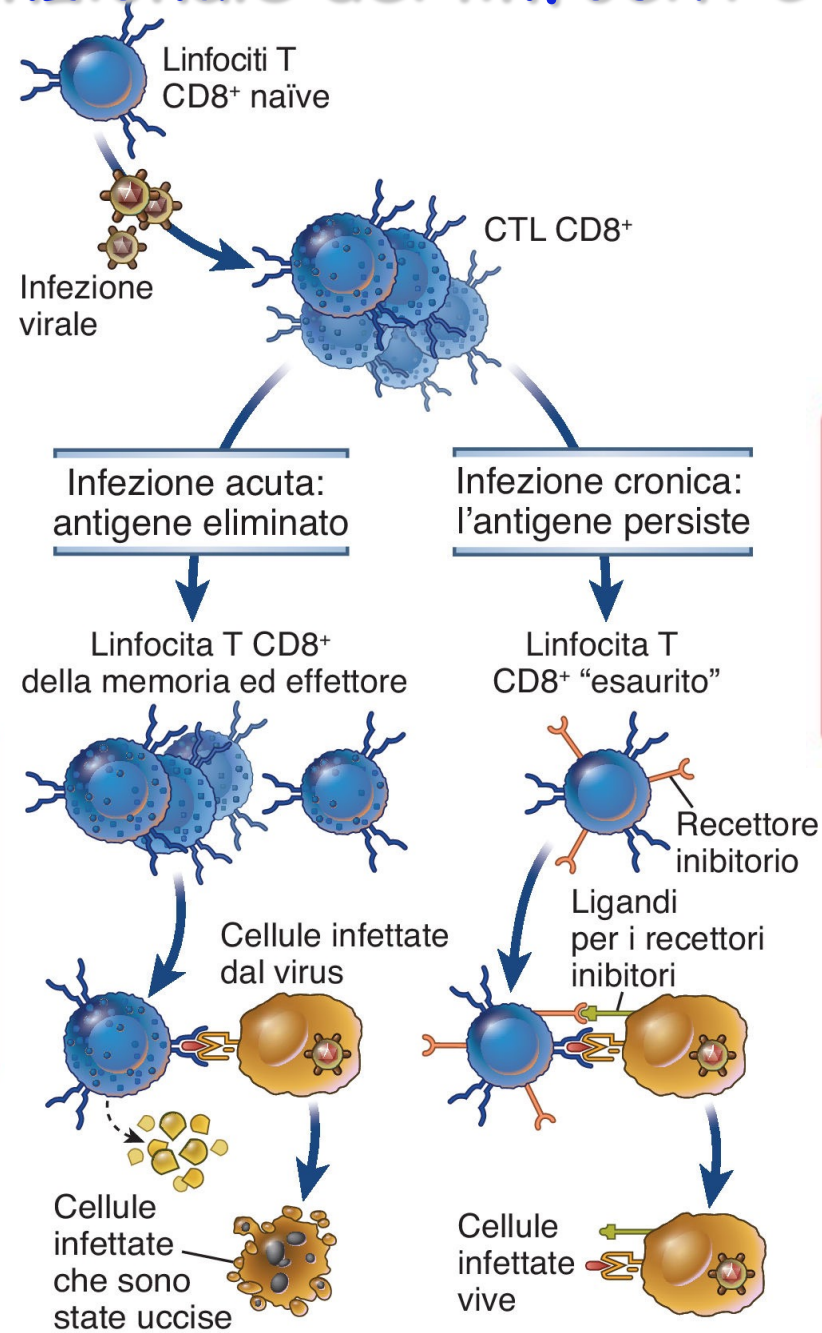


HSV= Virus Herpes Simplex

EBV= Virus di Epstein-Barr

CMV= Citomegalovirus

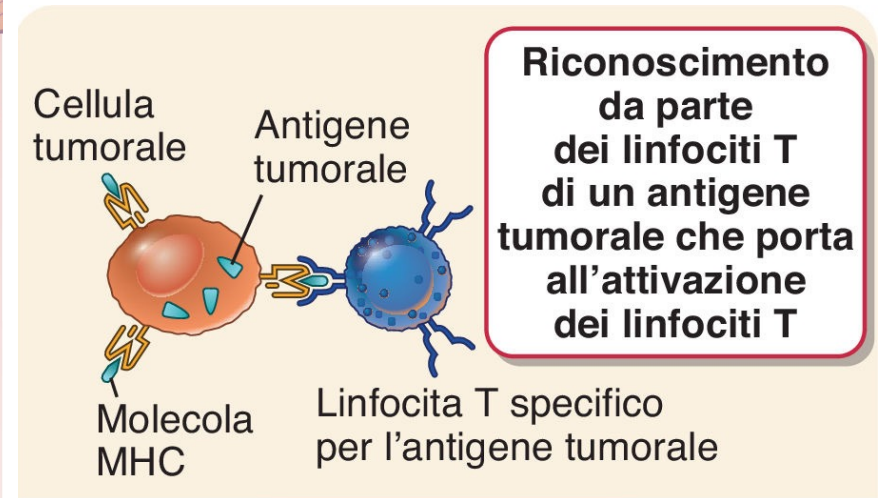
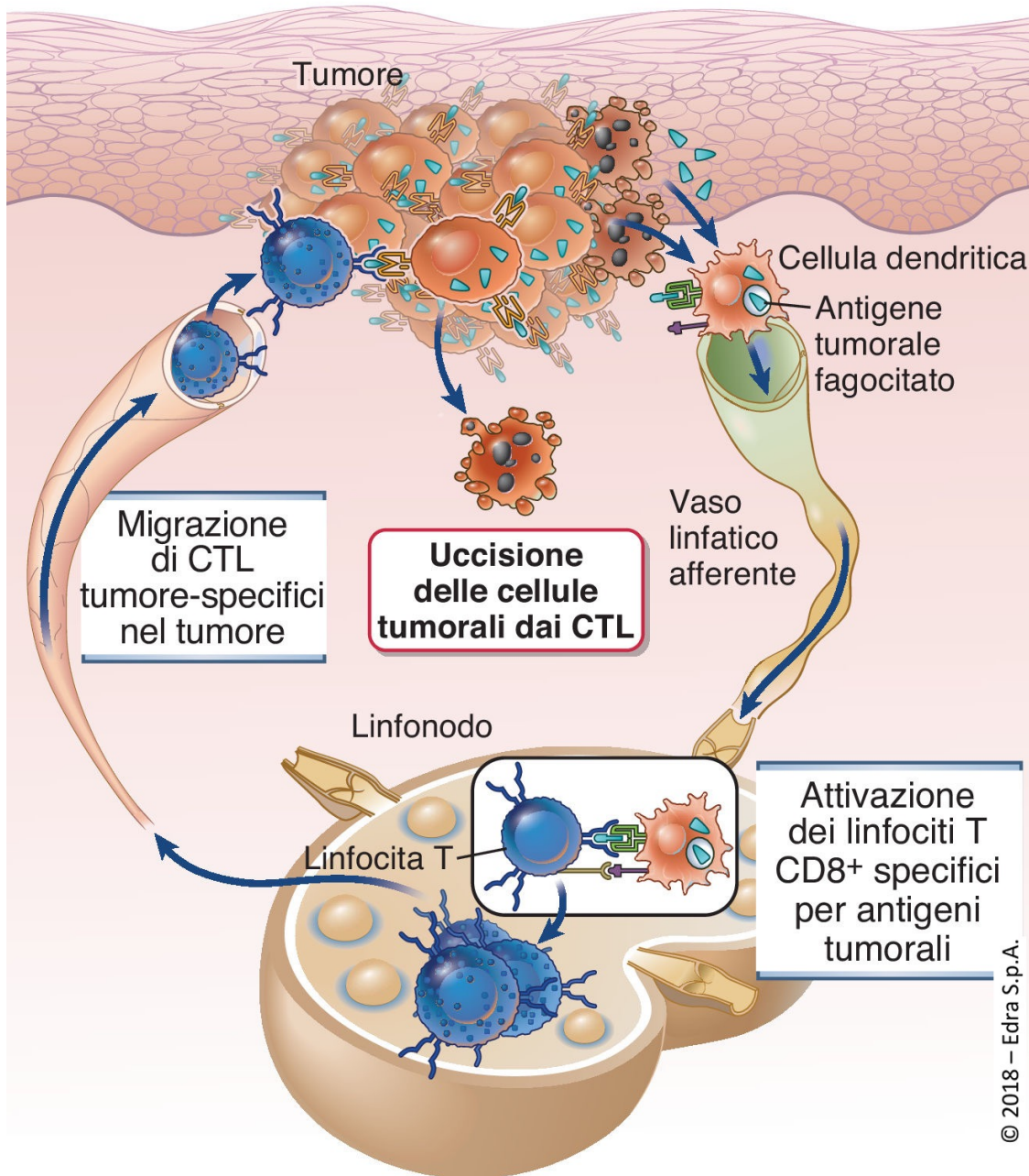
L'infezione cronica può causare l'esaurimento funzionale dei linfociti CTL



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

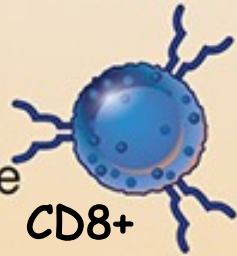


Meccanismi utilizzati dai tumori per evadere la risposta dei CTL

Difetto di presentazione degli antigeni tumorali

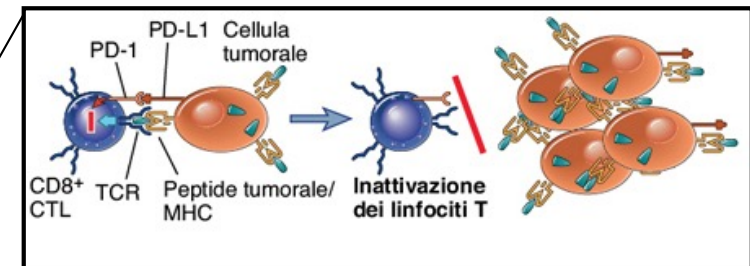


Cellula tumorale
priva dell'MHC
di classe I

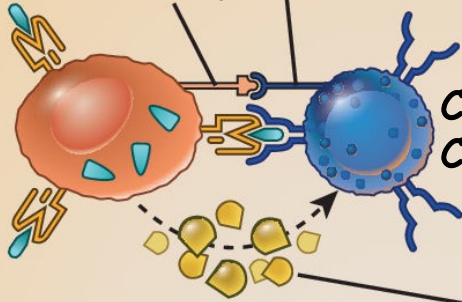


CD8+
CTL

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

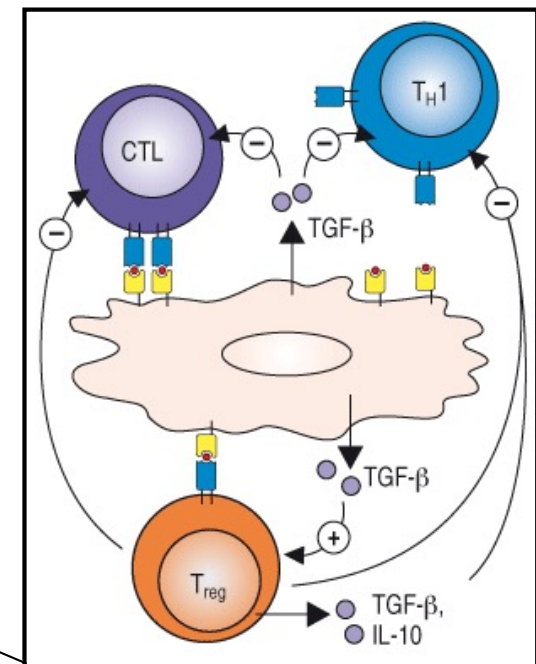


**Produzione di proteine immunosoppressive
o espressione di proteine inibitorie di membrana**
Ligandi inibitori Recettori inibitori (per es. PD-1)
(per es. PD-L1)



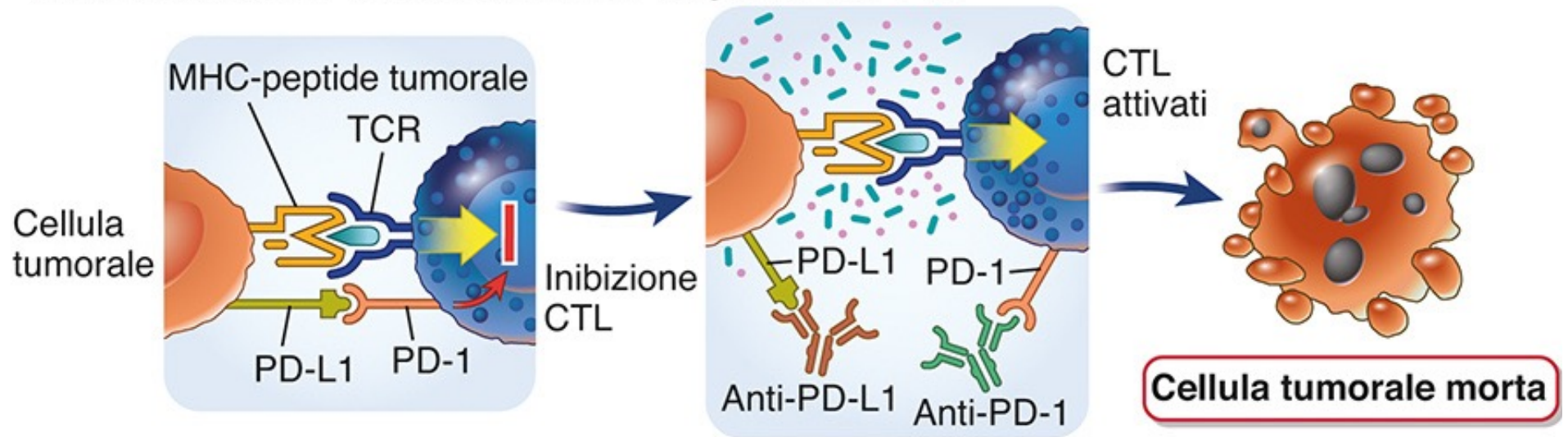
**Inibizione
dell'attivazione
dei linfociti T**

Citochine immuno-
soppressive
(per es. TGF- β)



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

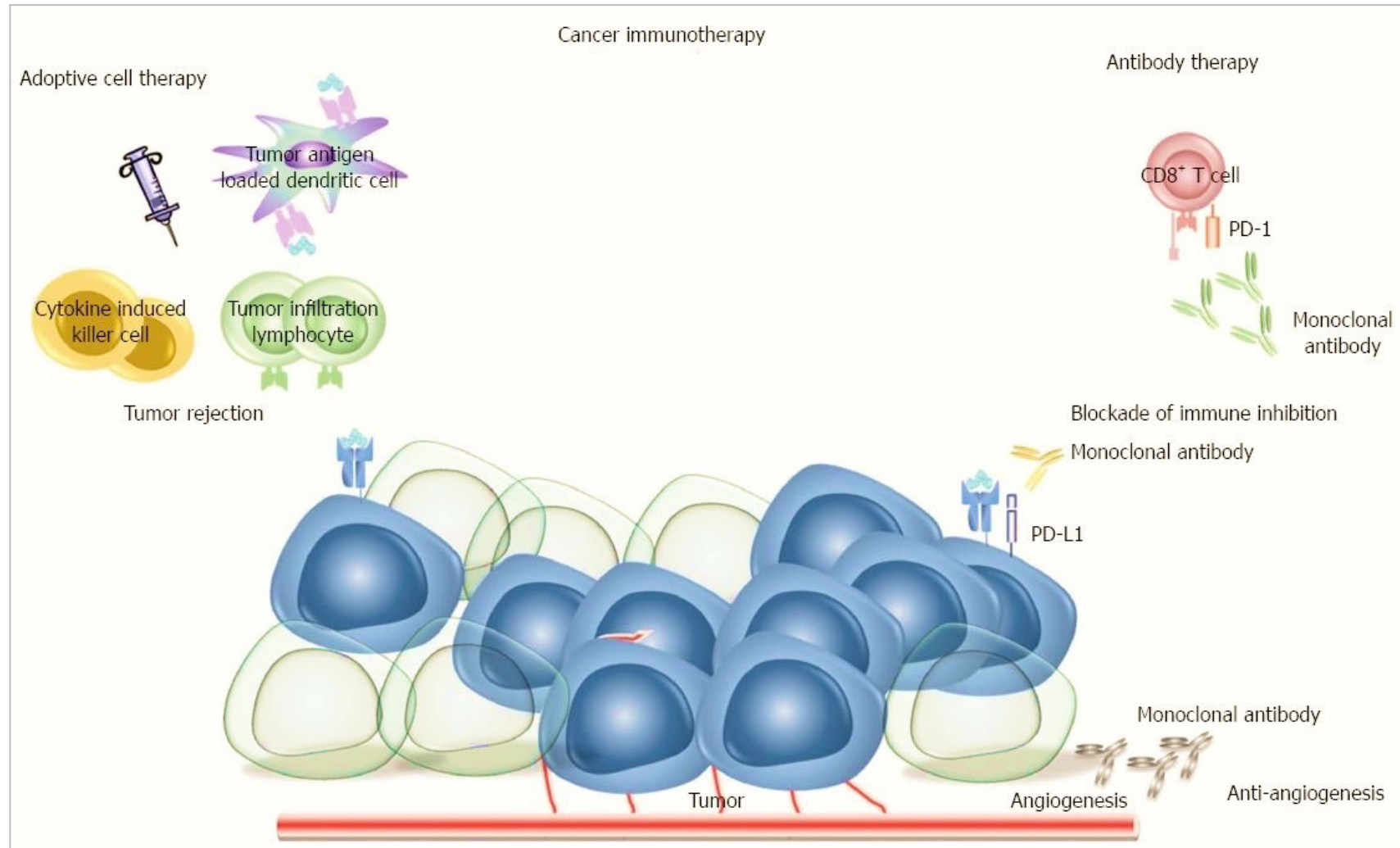
Uccisione delle cellule tumorali da parte dei CTL



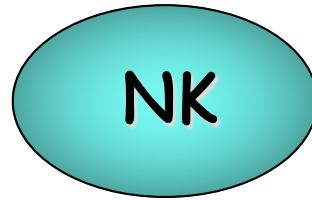
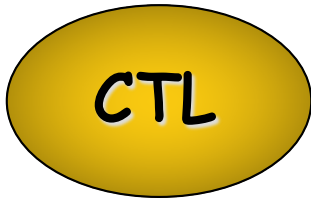
2014

Come potenziare l'azione dei CTL??

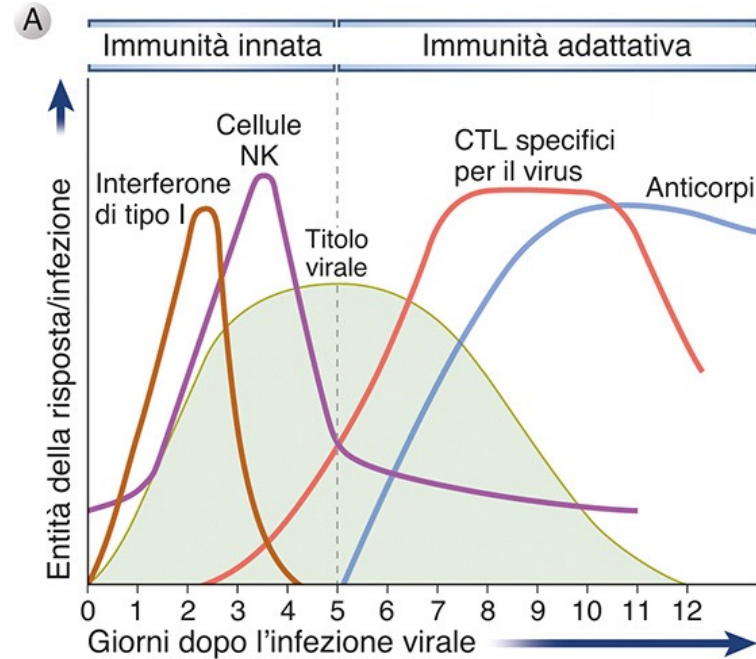
premere sull'acceleratore e bloccare i freni inibitori



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 !