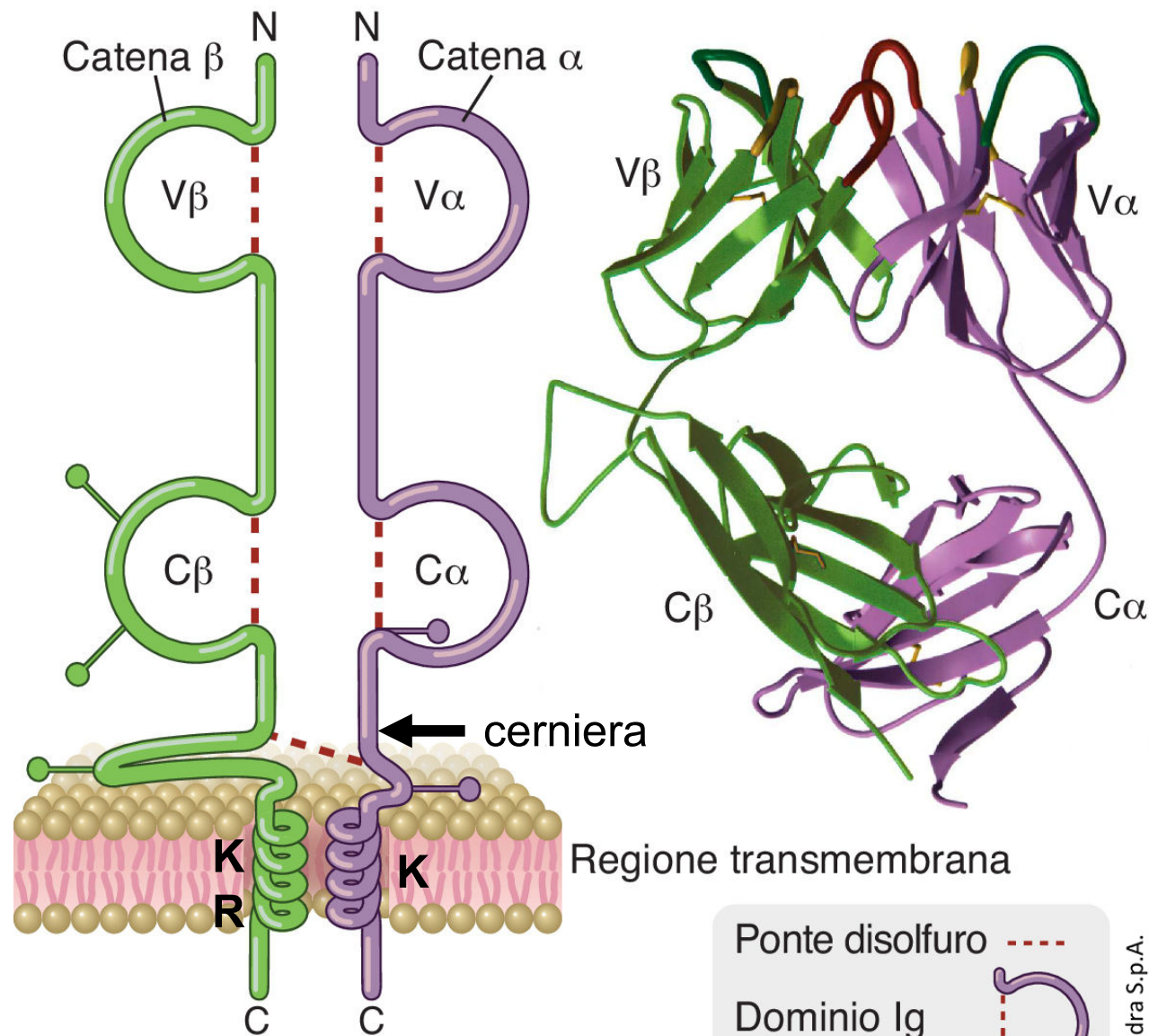


**Trasduzione del segnale via TCR  
e  
attivazione dei linfociti T**

# Struttura del TCR



Due catene polipeptidiche: **catena  $\alpha$**  e  **$\beta$**  ciascuna costituita da un dominio **Ig-like V (variabile)** e un dominio **Ig-like C (costante)** (foglietti  $\beta$  anti-paralleli connessi da anse).

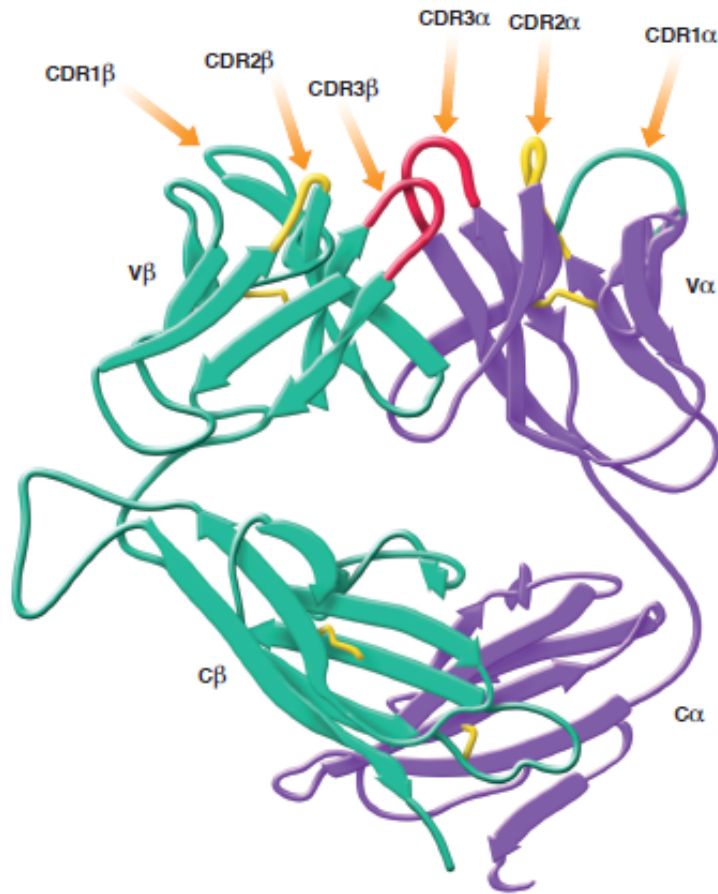
Ponte disolfuro

Dominio Ig

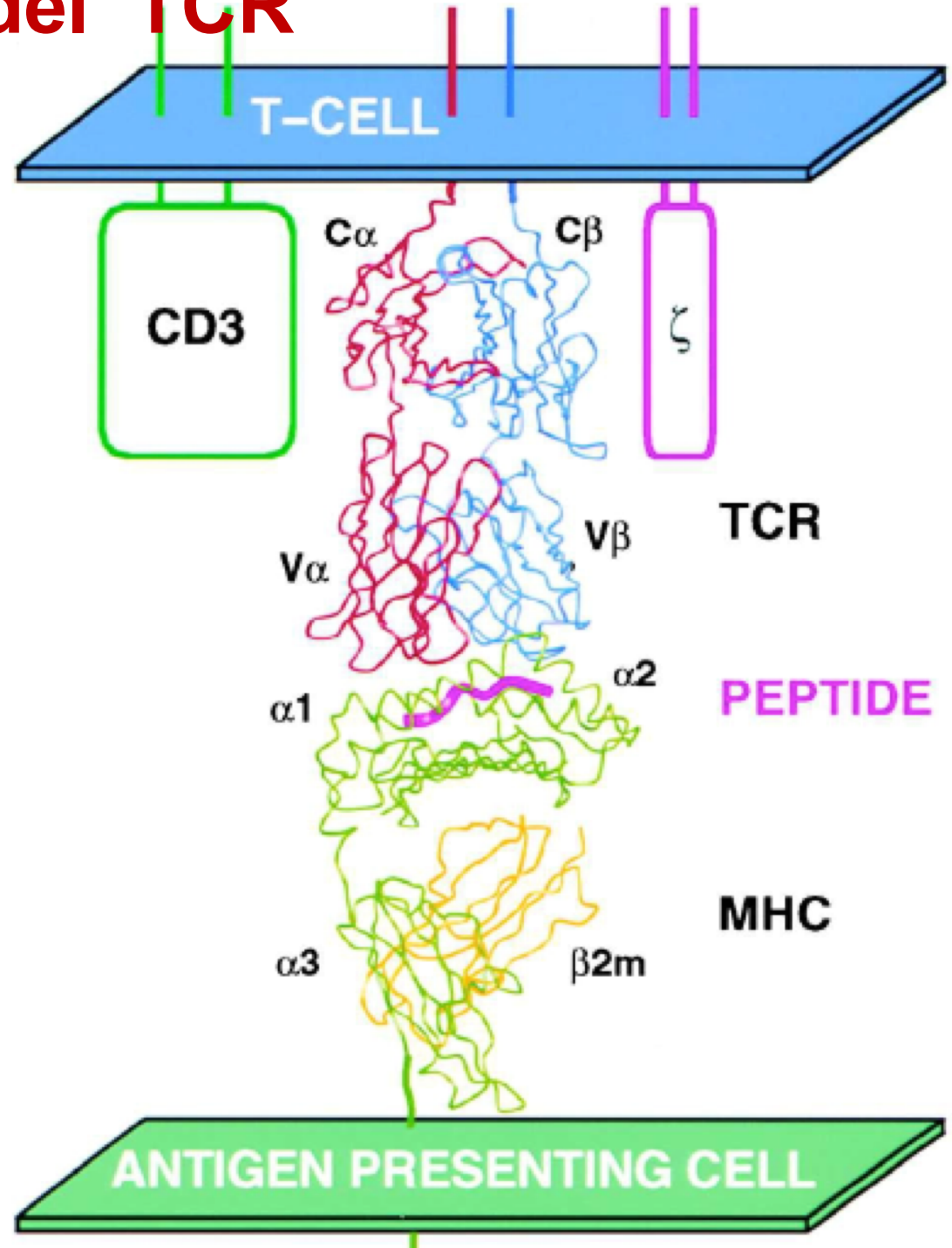
Gruppo carboidrato

© 2018 – Edra S.p.A.

# Struttura del TCR



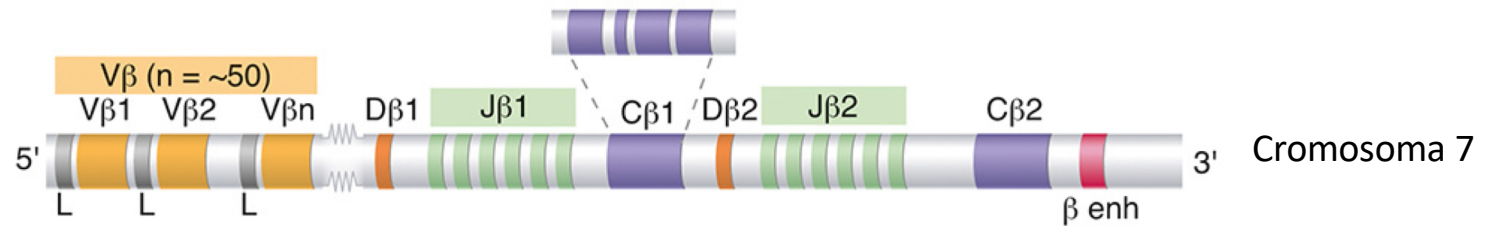
Ciascun dominio  $V\alpha$  e  $V\beta$  contiene 3 CDR (Complementary-determining regions; CDR1, CDR2 e CDR3). Queste sono le regioni ove si concentra la variabilità dei TCR (come nei domini Ig degli Ab) e sono coinvolte nell'interazione con il peptide e l'MHC. Nei **CDR3**  $\alpha$  e  $\beta$  si riscontra la massima variabilità.



# Organizzazione dei loci genici del recettore dei linfociti T umani in configurazione germinativa

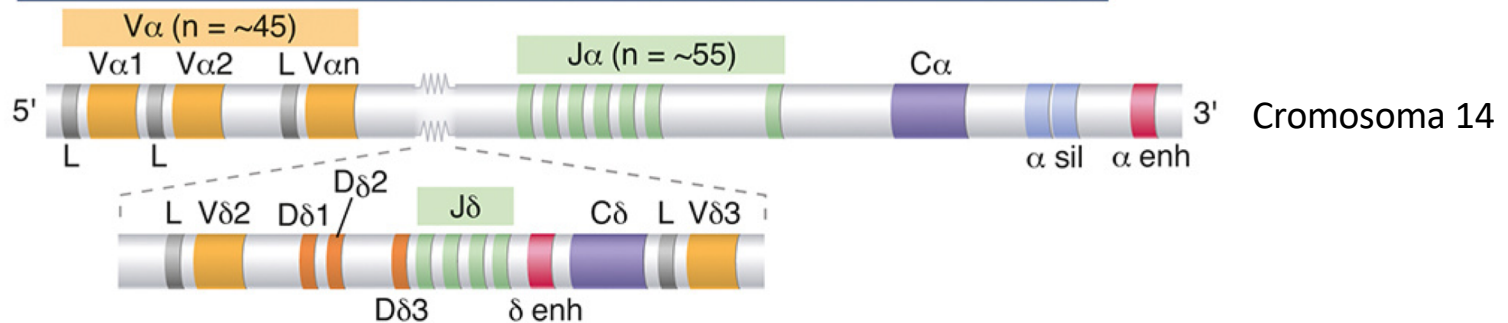
Locus della catena  $\beta$  del TCR nell'uomo (620 kb; cromosoma 7)

Catena  $\beta$   
(V, D, J, C)

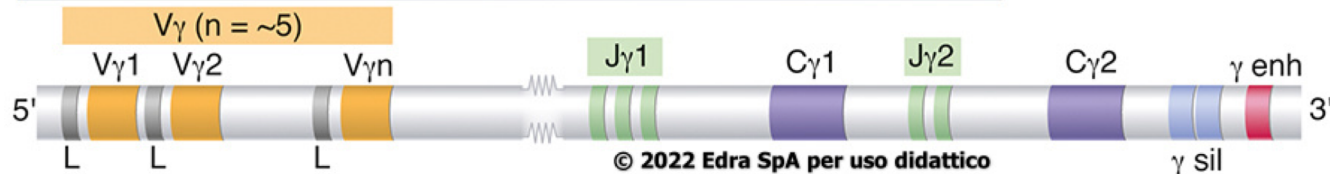


Locus delle catene  $\alpha$  e  $\delta$  del TCR nell'uomo (1000 kb; cromosoma 14)

Catena  $\alpha$   
(V, J, C)

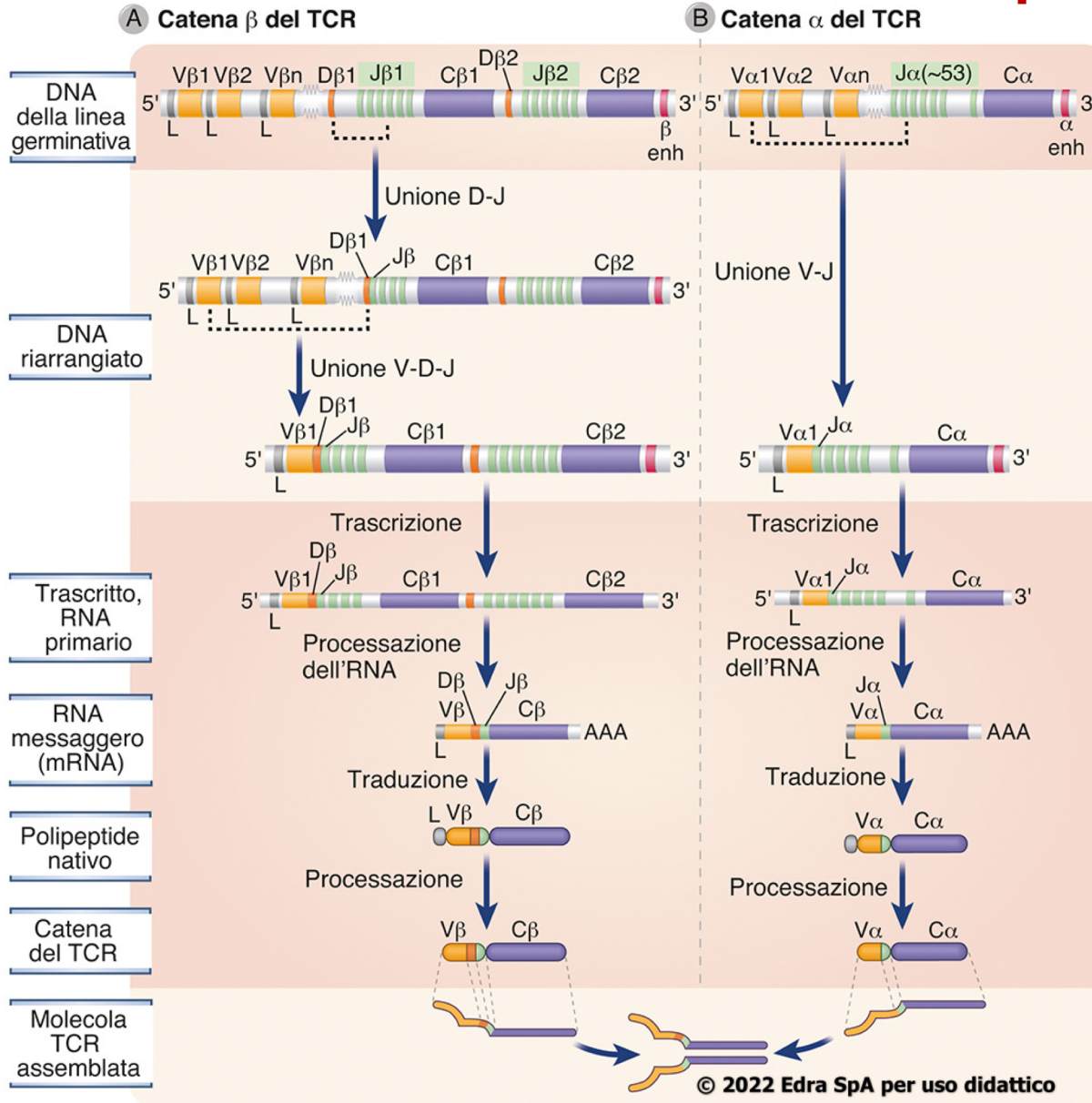


Locus della catena  $\gamma$  del TCR nell'uomo (200 kb; cromosoma 7)



Sono illustrati i geni per le catene  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  del recettore dei linfociti T (TCR) nell'uomo. Gli esoni e gli introni non sono riprodotti in scala e non vengono mostrati gli pseudogeni non funzionali. Ogni gene costante (C) è mostrato come singolo riquadro, pur essendo costituito da diversi esoni, come illustrato per  $C\beta 1$ . I segmenti genici sono indicati come: C, costante; D, diversità; enh, enhancer; J, giunzione; L, leader (comunemente definito sequenza segnale); sil, silencer; V, variabile (sequenze che regolano la trascrizione del gene per il TCR).

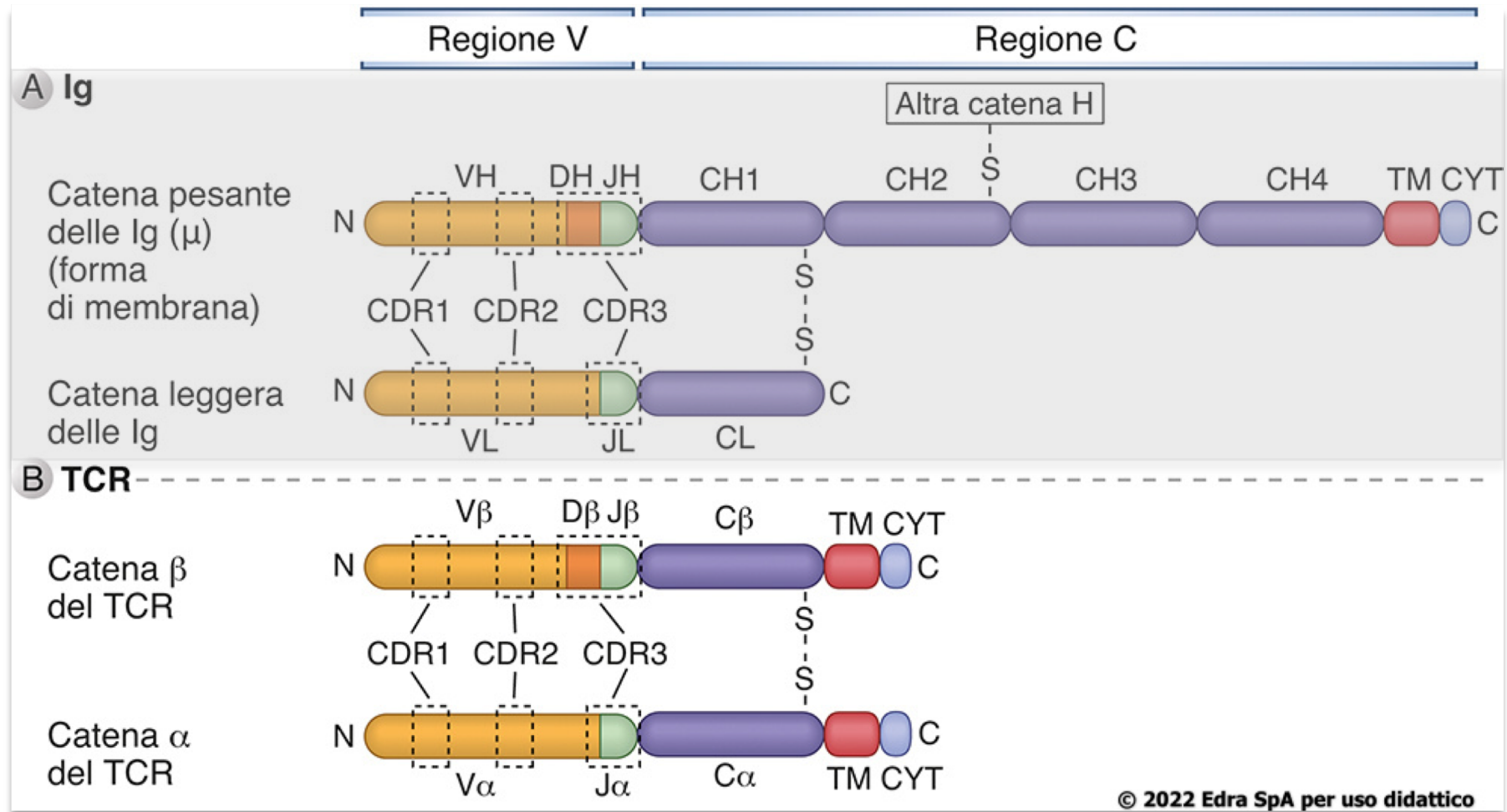
# Ricombinazione ed espressione dei geni per le catene $\alpha$ e $\beta$ del TCR



**Ricombinazione ed espressione dei geni per le catene  $\alpha$  e  $\beta$  del recettore del linfocita T.** Viene mostrata la sequenza di eventi di ricombinazione e espressione genica per le catene  $\beta$  e  $\alpha$  del recettore del linfocita T (TCR). In A, la regione variabile (V) della catena  $\beta$  del TCR riarrangiato include i segmenti genici  $V\beta 1$  e  $D\beta 1$  e il terzo segmento J nel raggruppamento  $J\beta 1$ . La regione costante (C) in questo esempio è codificata dagli esoni del gene  $C\beta 1$ , illustrato per praticità come singolo esone (anche se in realtà è composto da quattro esoni con tre introni intermedi). Si noti che nel locus della catena  $\beta$  del TCR nell'uomo, il riarrangiamento inizia con l'unione D-J seguita dalla giunzione V-DJ. Sempre nell'uomo sono stati identificati 14 segmenti genici  $J\beta$  (non tutti riportati in figura). Nell'esempio mostrato in B, la regione V della catena  $\alpha$  del TCR include il gene  $V\alpha 1$  e il secondo segmento J nel raggruppamento  $J\alpha$  (nell'uomo questo raggruppamento è costituito da almeno 61 segmenti genici  $J\alpha$ , non tutti riportati in figura).

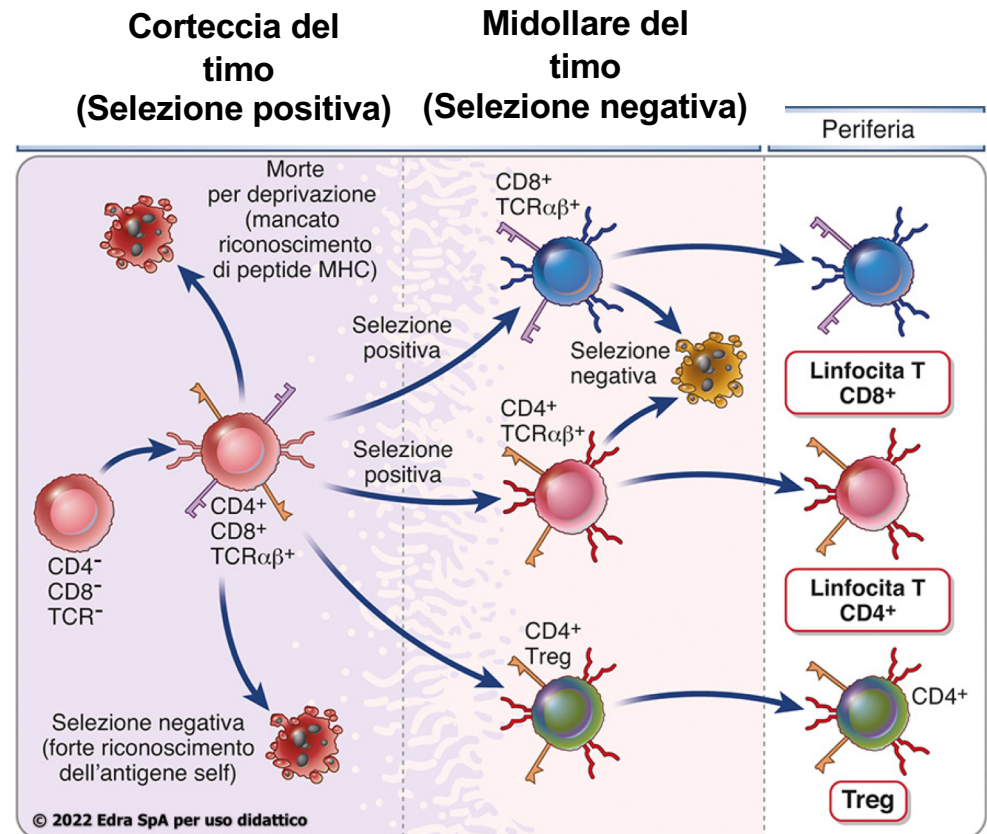
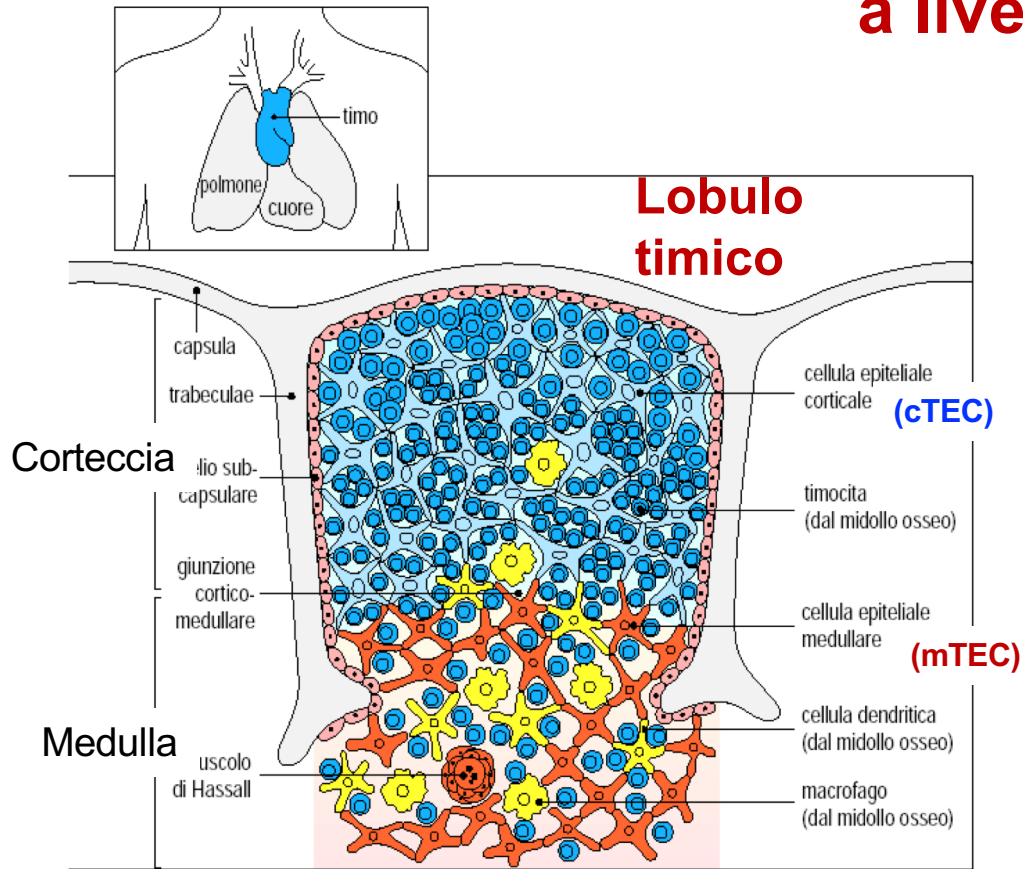
Per la ricombinazione sono essenziali le ricombinasi (V (D) J) chiamate **RAG1** e **RAG2**

# Domini delle proteine del recettore dei linfociti T



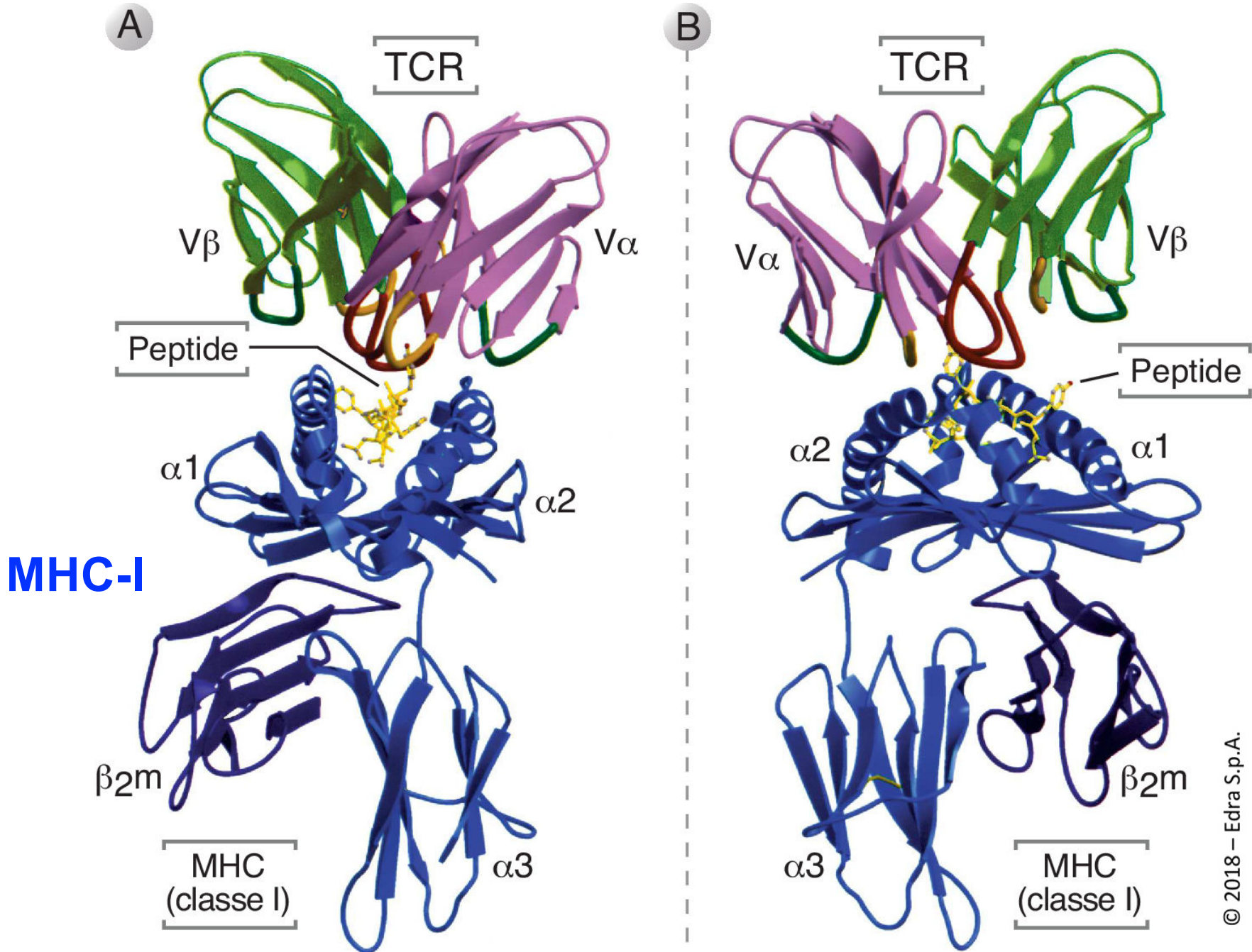
In A sono mostrati i domini delle catene leggere e pesanti delle immunoglobuline (Ig) e in B quelli delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  del recettore dei linfociti T (TCR). Sono anche indicate le relazioni tra i segmenti genici per le Ig e per il TCR e la struttura a domini delle catene polipeptidiche. Le regioni variabili (V) e costanti (C) di ciascun polipeptide sono codificate da diversi segmenti genici. La localizzazione dei ponti disolfuro (S-S) sono approssimative. Le aree nei riquadri tratteggiati rappresentano le regioni di ipervariabilità (determinanti la complementarità). Nelle catene  $\mu$  delle Ig e nelle catene  $\alpha$  e  $\beta$  del TCR, i domini transmembrana (TM) e citoplasmatico (CYT) sono codificati da esoni diversi. Le lettere N e C si riferiscono alle terminazioni amino- e carbossiterminali, rispettivamente.

# Processo di maturazione dei linfociti T a livello timico



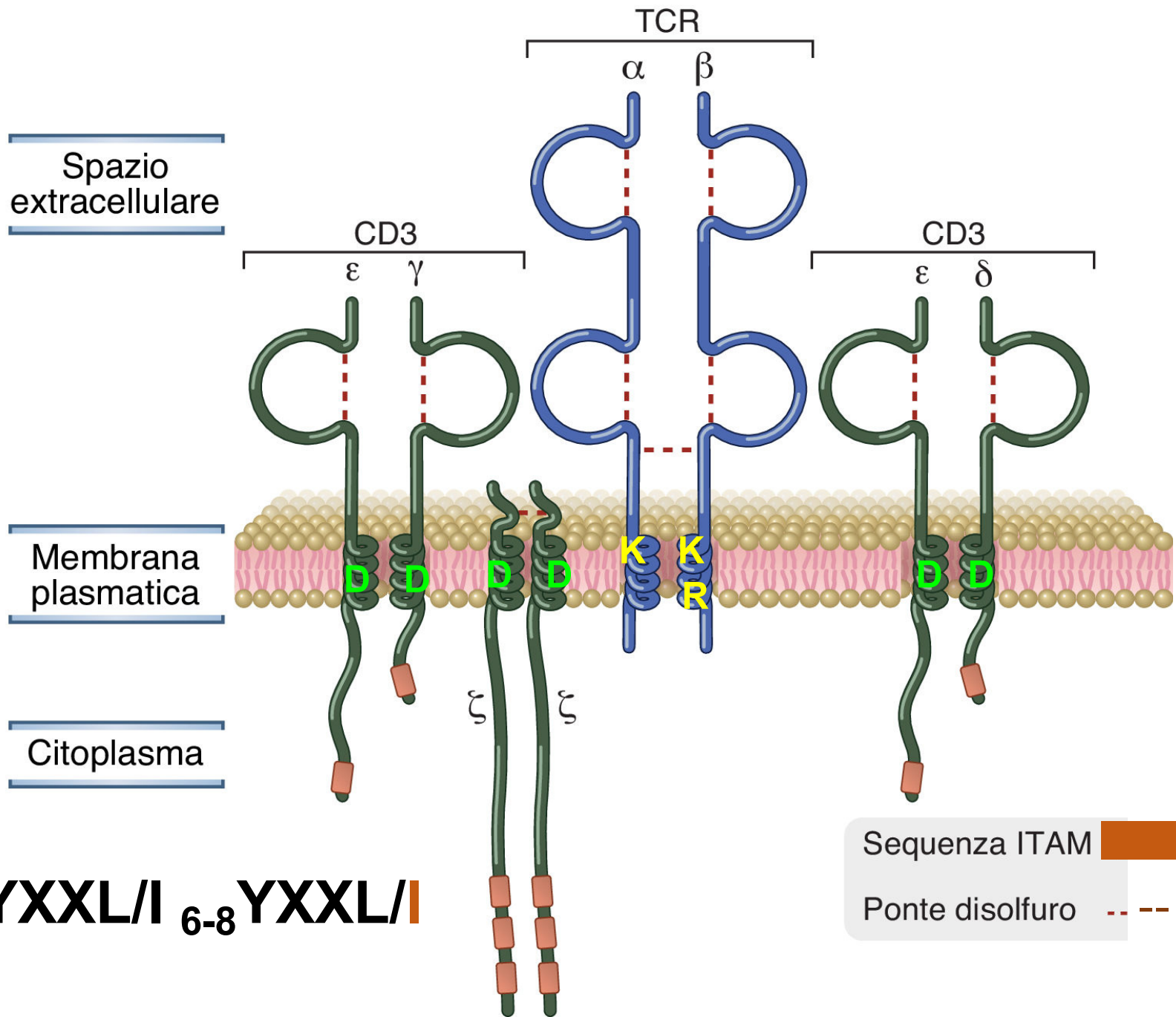
I precursori dei linfociti T migrano dal midollo osseo al timo attraverso il circolo ematico. I progenitori dei linfociti T  $\alpha\beta$  sono cellule doppio-negative (DN ovvero CD8-CD4-) che, nella corteccia timica, cominciano a esprimere i recettori dei linfociti T (TCR) e i corecettori CD4 e CD8. I processi di selezione eliminano sia i linfociti T autoreattivi allo stadio di doppio-positivo (DP) nella corticale sia i timociti singolo-positivi (SP) nella midollare del timo. Gli stessi processi di selezione promuovono inoltre la sopravvivenza dei timociti dotati di TCR che legano molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) con scarsa affinità. La selezione e la differenziazione funzionale dei linfociti T CD4+CD8- o CD8+CD4- (SP) avviene a livello della midollare e i linfociti T maturi vengono successivamente immessi in circolo. Alcune cellule DP si differenziano in linfociti T regolatori CD4+CD8- (Treg). Lo sviluppo di linfociti T  $\gamma\delta$  non è riportato in figura. MHC (Major Histocompatibility Complex), complesso maggiore di istocompatibilità; TCR (T Cell Receptor) recettore dei linfociti T.

# Interazione TCR con i complessi peptide-MHC



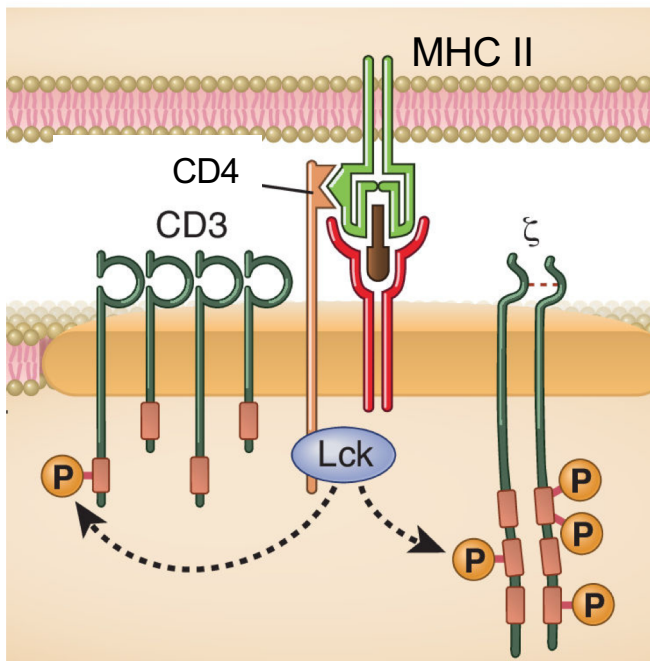


# II Complesso TCR/CD3

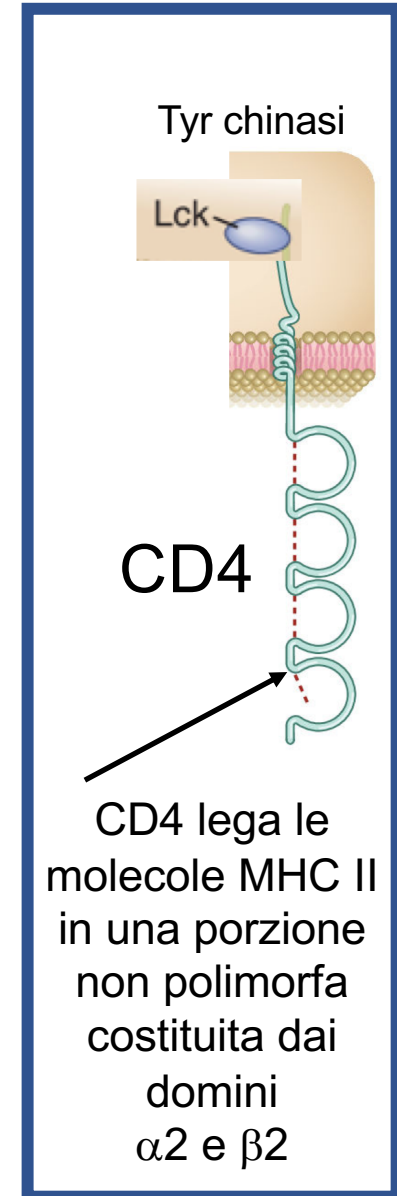
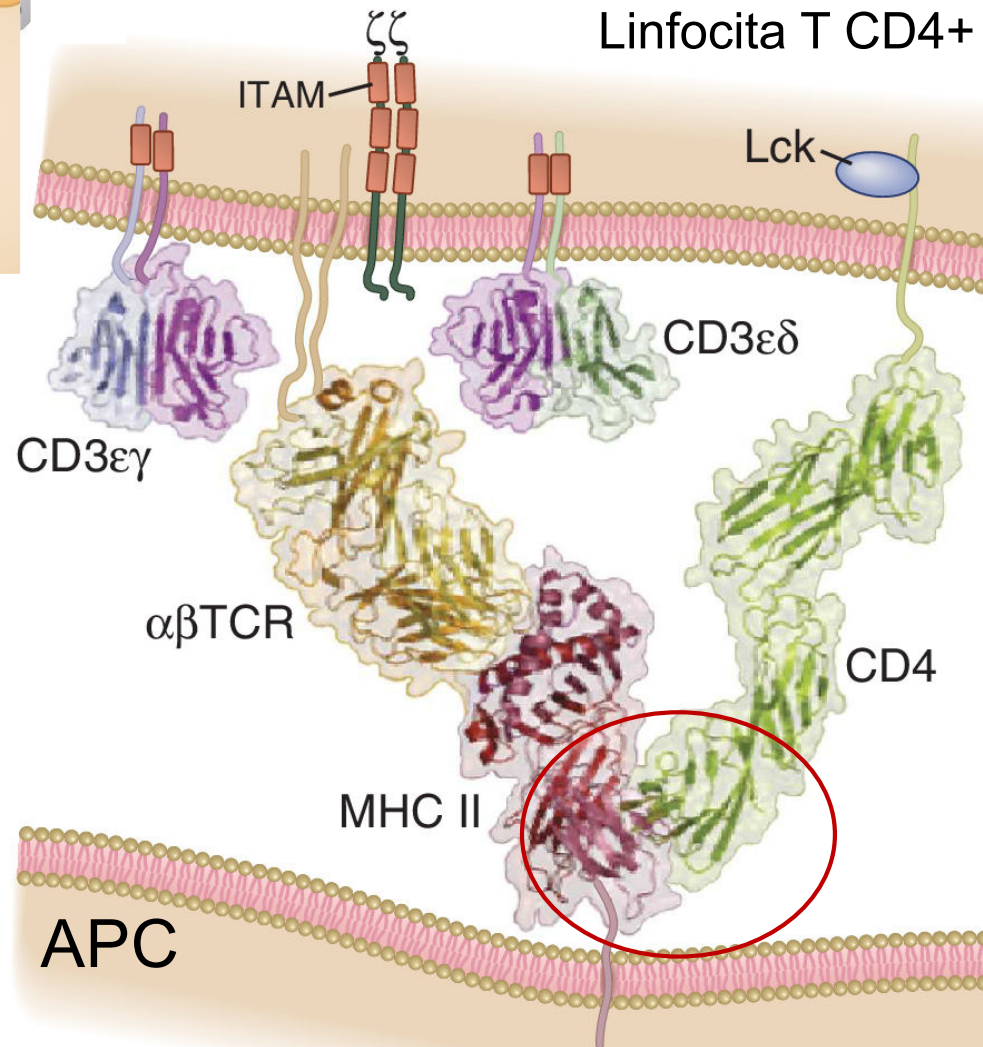


**ITAM: YXXL/I** <sub>6-8</sub> **YXXL/I**

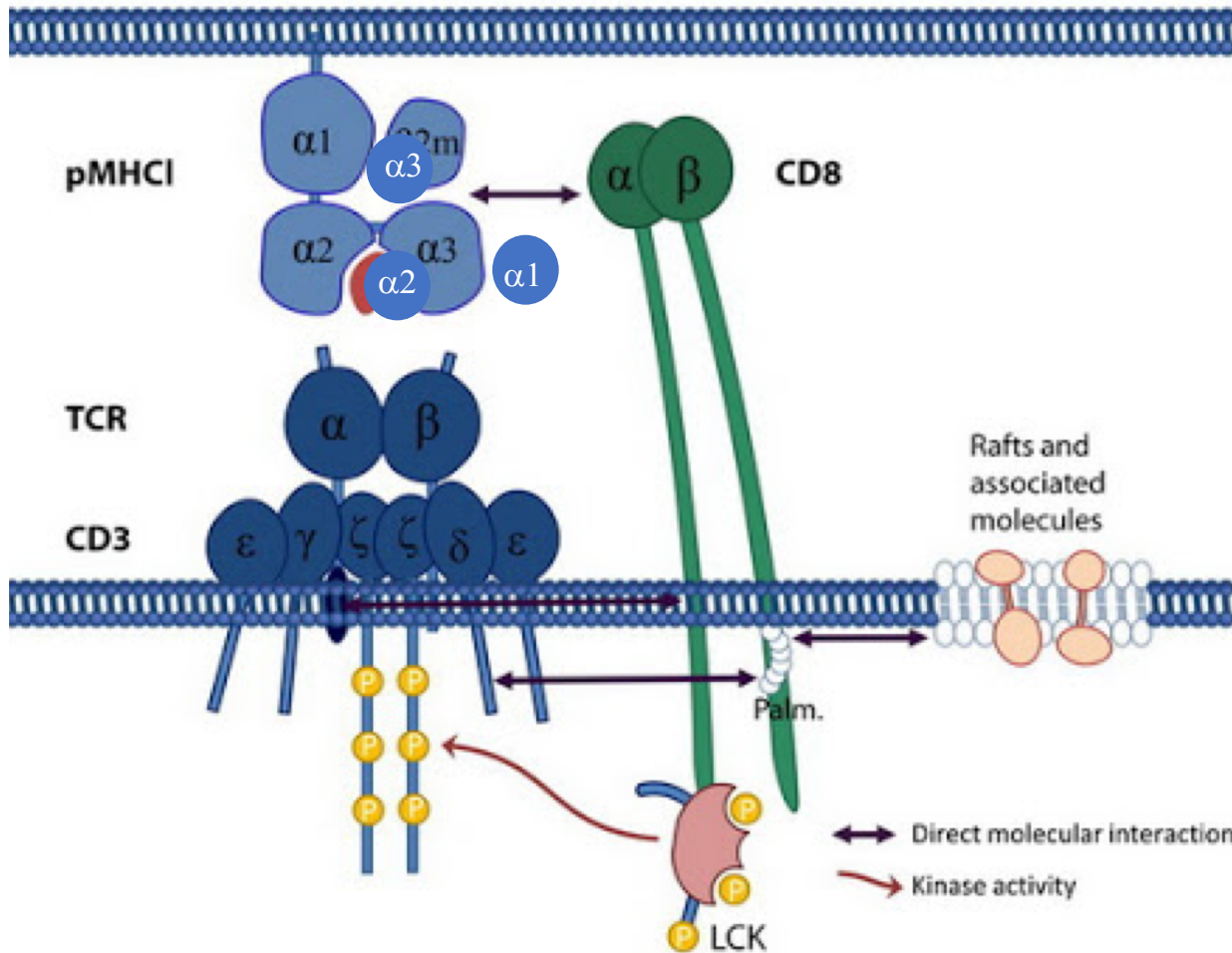
# TCR e co-recettore CD4 nel riconoscimento peptide/MHC II



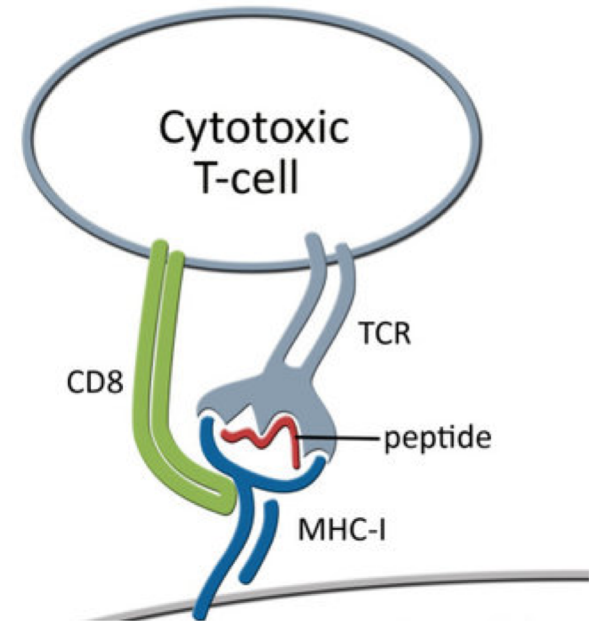
Lck è costitutivamente associata con il dominio citoplasmatico del CD4



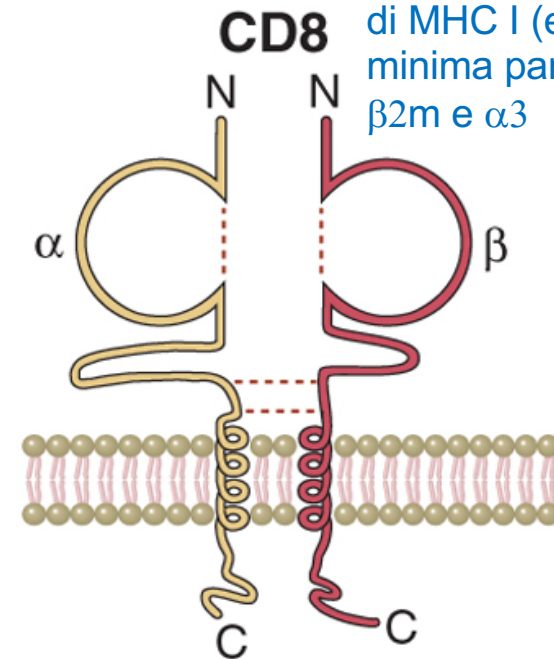
# TCR e co-recettore CD8 nel riconoscimento peptide/MHC I



Lck è costitutivamente associata al dominio citoplasmatico del CD8

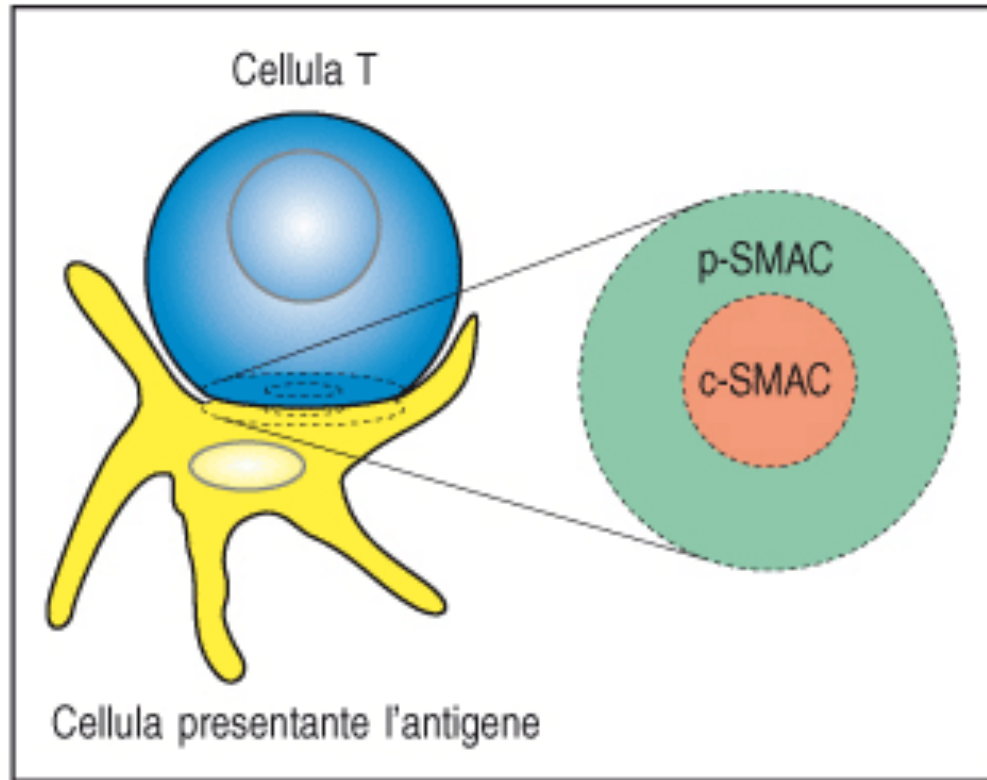


Interazione con il dominio non polimorfo  $\alpha 3$  di MHC I (ed in minima parte con  $\beta 2m$  e  $\alpha 3$ )



# La sinapsi immunologica

detta anche **SMAC=supramolecular activation cluster** è la regione di contatto tra linfociti T ed APC

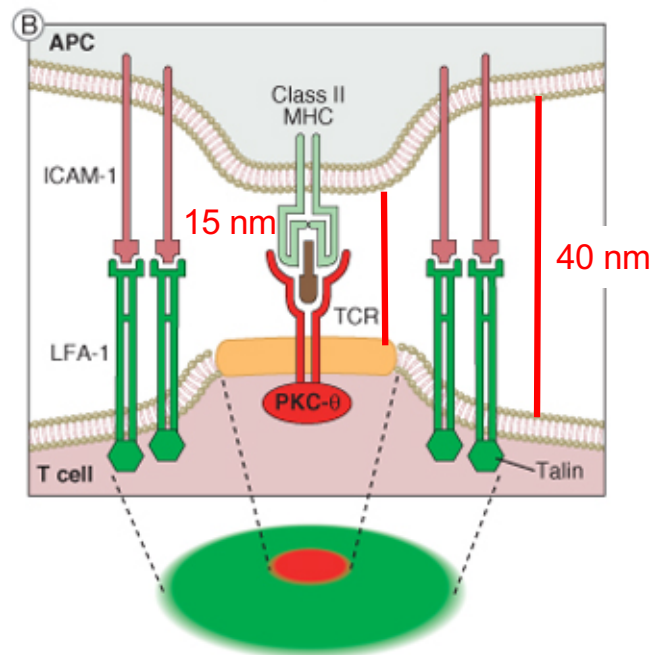
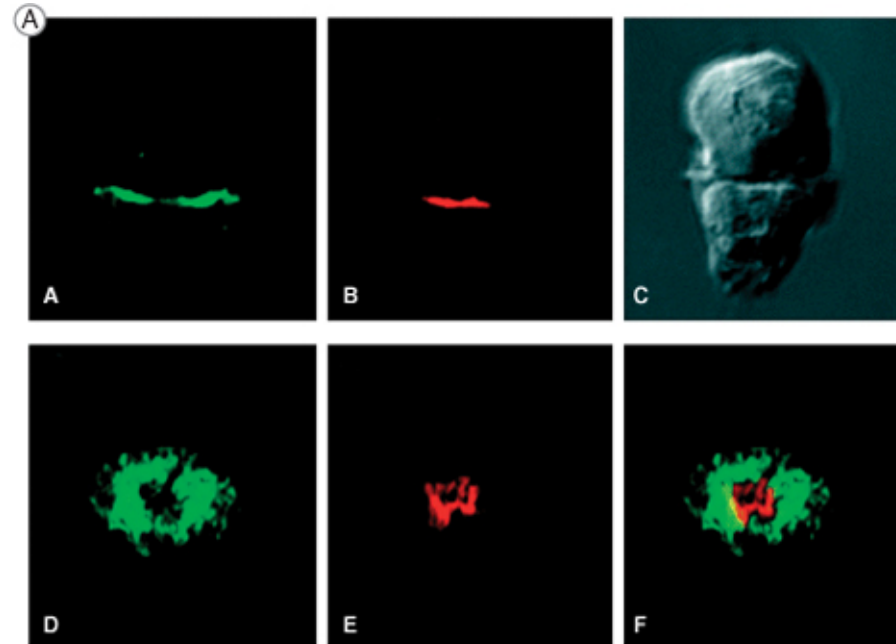
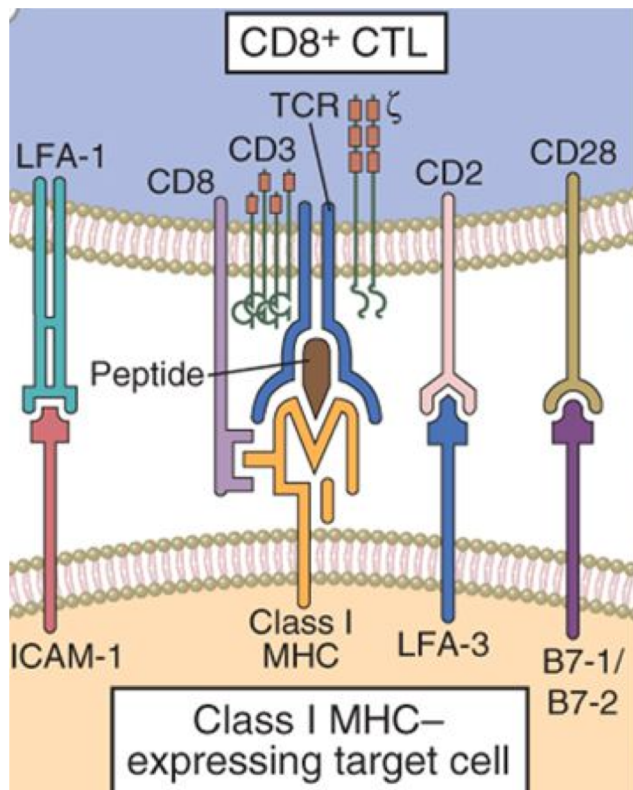
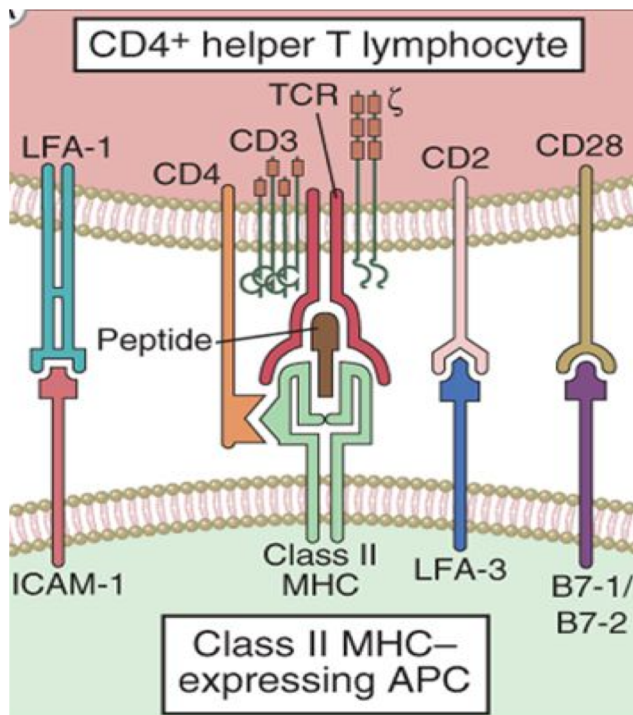


**c-SMAC** (central-supramolecular activation cluster): **cluster di attivazione sopramolecolare centrale**, contiene i recettori coinvolti nel riconoscimento e nella trasduzione (CD4 o CD8, TCR, CD28) e le molecole di segnalazione (rafts, protein chinasi, adattatori)

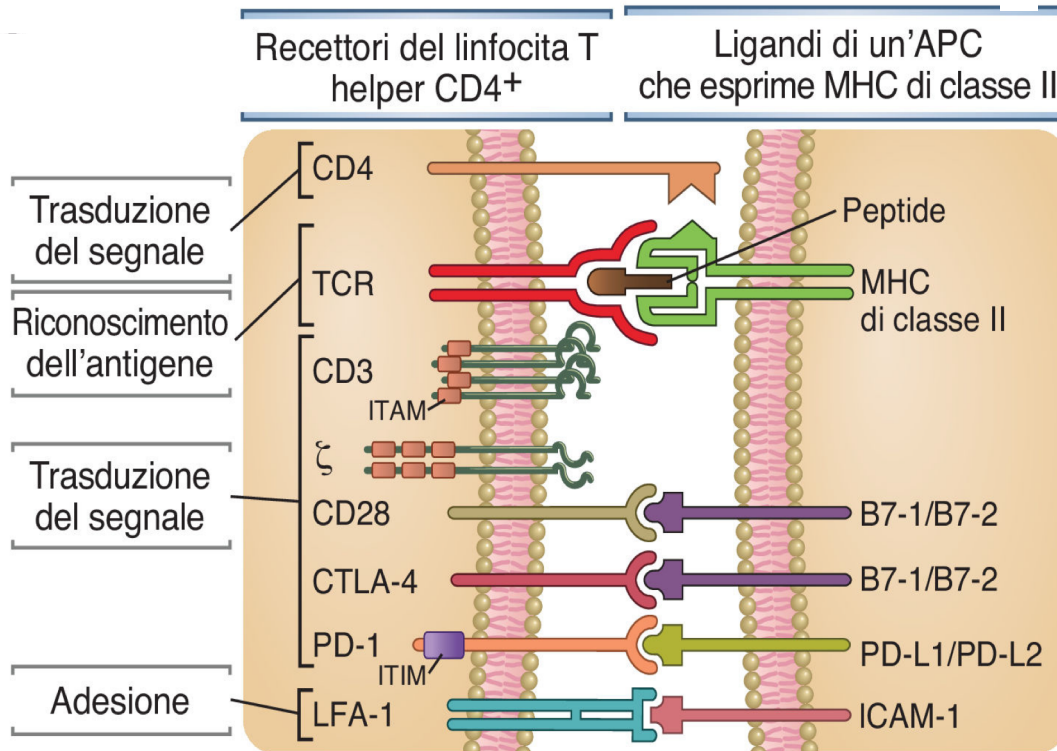
**p-SMAC** (peripheral-supramolecular activation cluster): **cluster di attivazione sopramolecolare periferico** contiene le molecole di adesione (LFA-1) e proteine citoscheletriche come la talina

c-SMAC	p-SMAC
TCR CD2 CD4 CD8 CD28 PKC-θ	LFA-1 ICAM-1 Talina

# Formazione della Sinapsi Immunologica (IS)

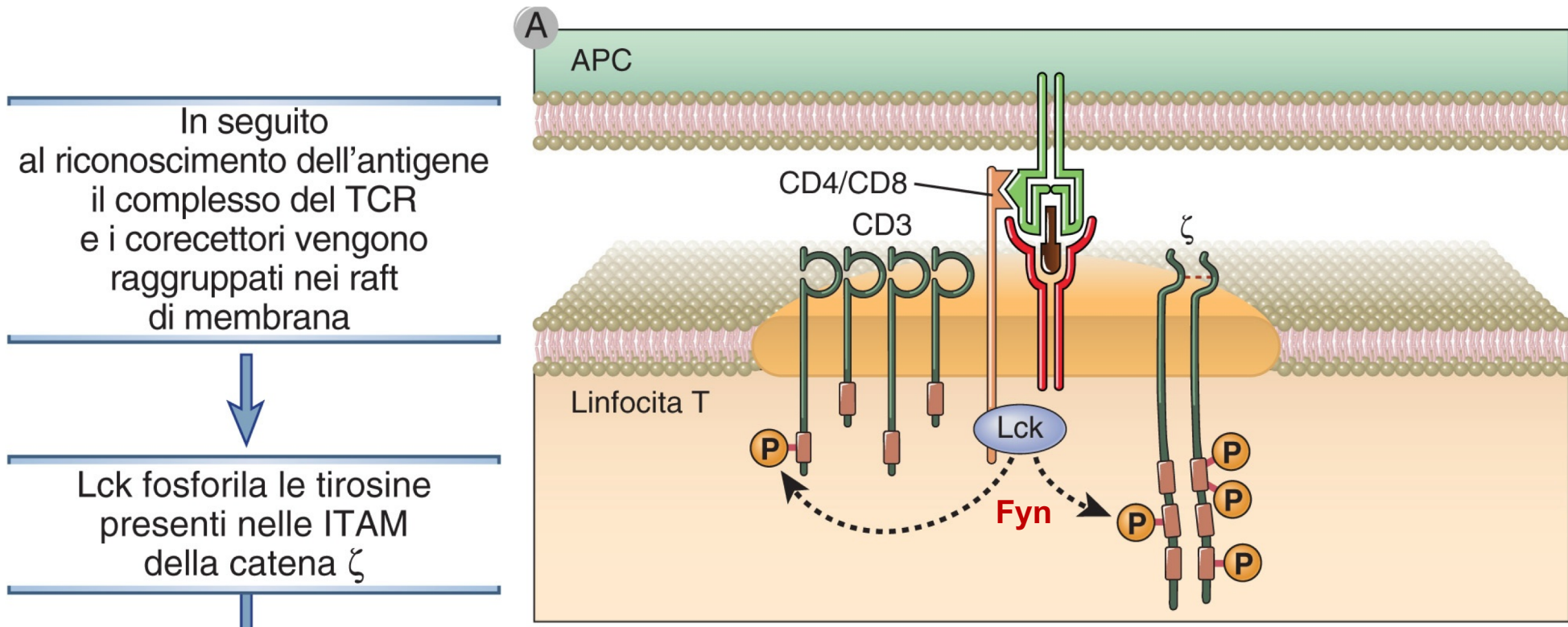


# Interazioni ligando-recettore coinvolte nell'attivazione ( o anche inibizione) dei linfociti T

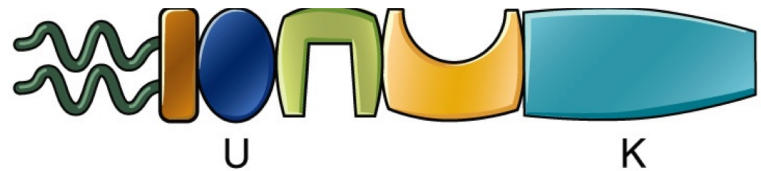


Molecole del linfocita T	Funzione	Ligando	
		Nome	Espresso da
CD3	Trasduzione del segnale del complesso del TCR	Nessuno	
Catene ζ	Trasduzione del segnale del complesso del TCR	Nessuno	
CD4	Trasduzione del segnale	MHC di classe II	Cellule che presentano l'antigene
CD8	Trasduzione del segnale	MHC di classe I	Tutte le cellule nucleate
CD28	Trasduzione del segnale (costimolazione)	B7-1/B7-2	Cellule che presentano l'antigene
CTLA-4	Inibizione	B7-1/B7-2	Cellule che presentano l'antigene
PD-1	Inibizione	PD-L1/PD-L2	Cellule che presentano l'antigen cellule tissutali, cellule tumorali
LFA-1	Adesione	ICAM-1	Cellule che presentano l'antigene, endotelio

# Riconoscimento dell'antigene → aggregazione del complesso del TCR con i co-recettori CD4/CD8 e fosforilazione delle ITAM ad opera di Lck

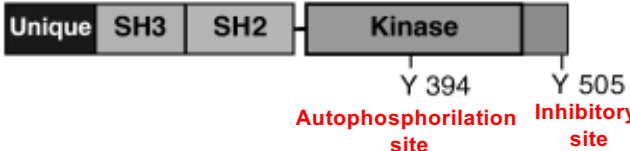
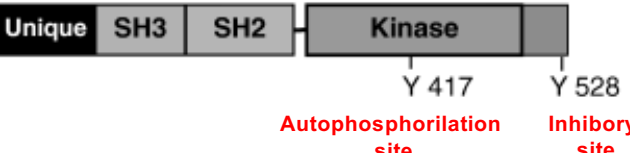


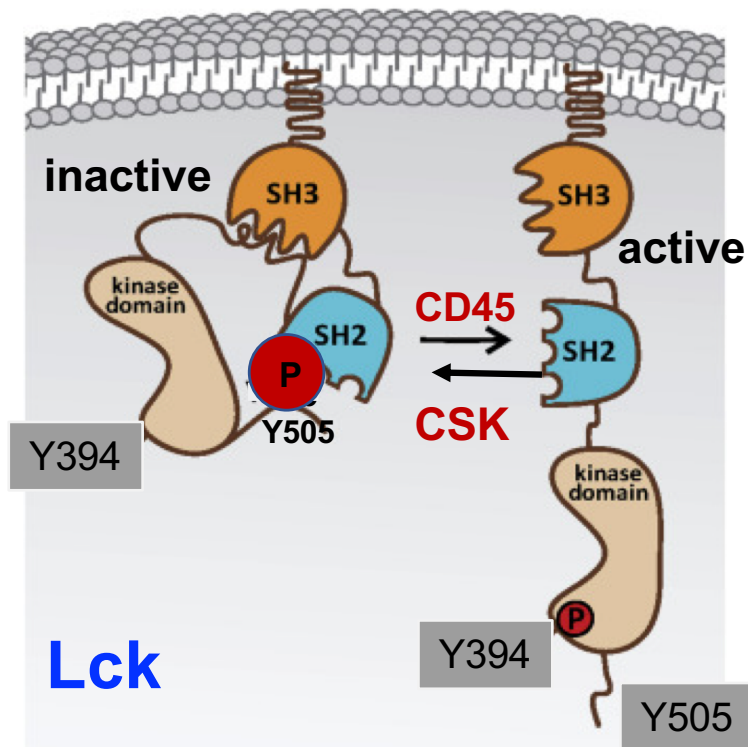
**Fyn:** un'altra Src kinasi associata al CD3 che partecipa alla fosforilazione delle ITAM



# Src Family Tyrosine Kinases in T cells

Molecules shown to associate with:

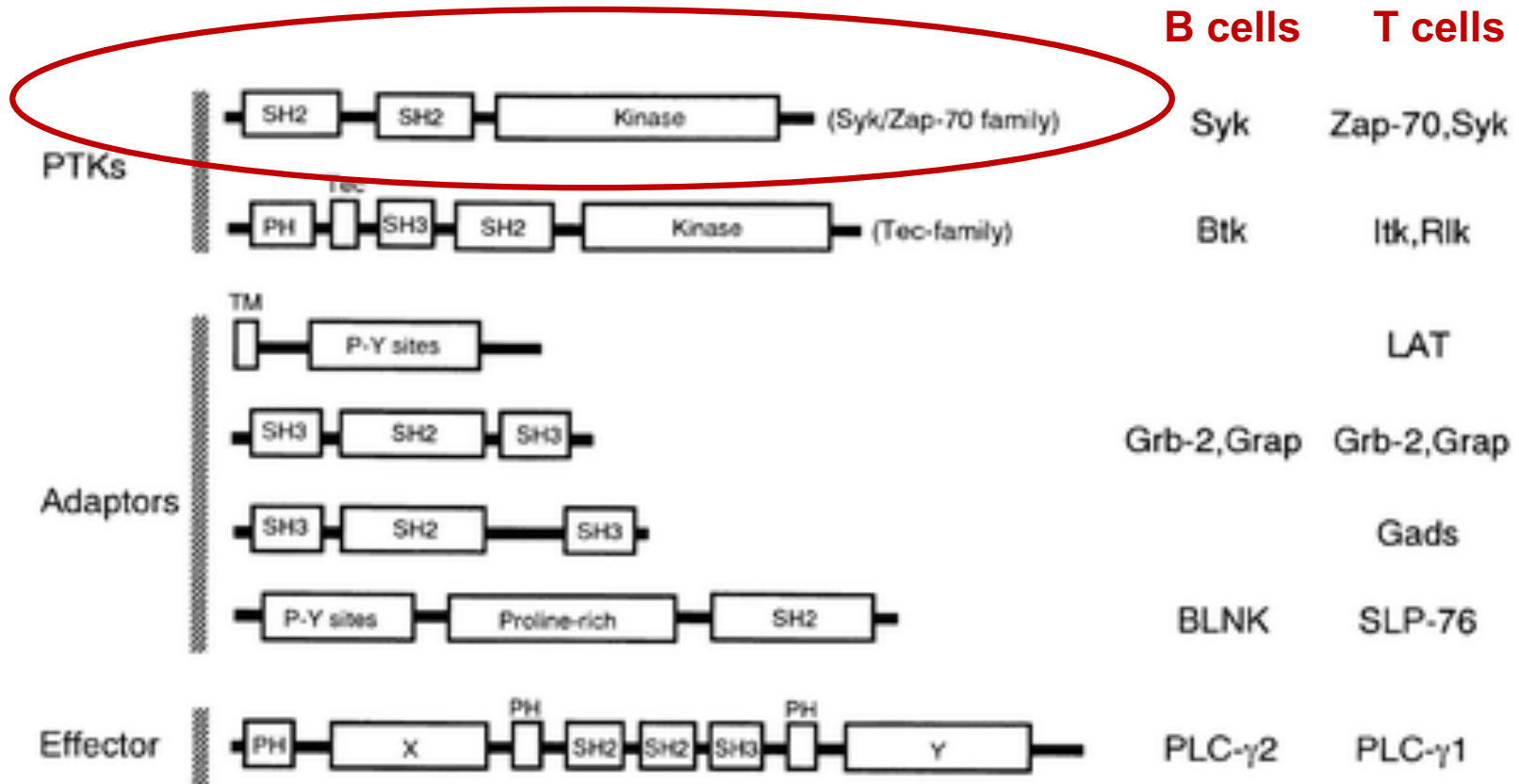
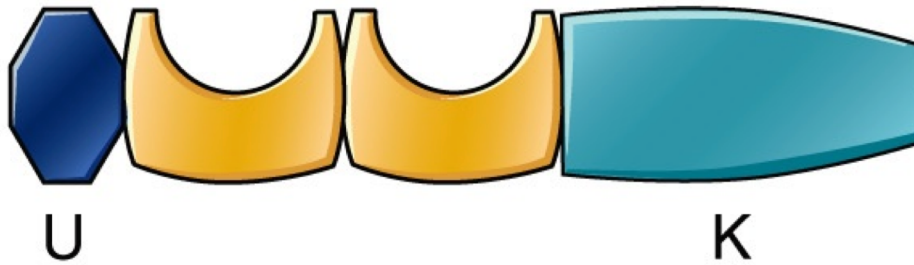
<p><b>Lck</b></p>  <p>Y 394 Autophosphorilation site</p> <p>Y 505 Inhibitory site</p>	<p>Cell Surface: CD4 &amp; CD8 (17,18), CD45 (69,70), CD2 (66), IL-2R (67)</p> <p>Intracellular: ZAP-70 (74), PI-3K (76,77), c-cbl (81), SAM68 (83), MAPK (71), RasGAP (78), raf 1 (79), LckBP1 (80), Lad/TSAAd (86),</p>
<p><b>Fyn</b></p>  <p>Y 417 Autophosphorilation site</p> <p>Y 528 Inhibitory site</p>	<p>Cell Surface: TCR (73), CD2 (66), IL-2R (68), Fas (72)</p> <p>Intracellular: ZAP-70 (75), PI-3K (77), c-cbl (82), SAM68 (83), Pyk2 (84), SAP/SLAM (85), Shc (87), Gab-2 (88)</p>



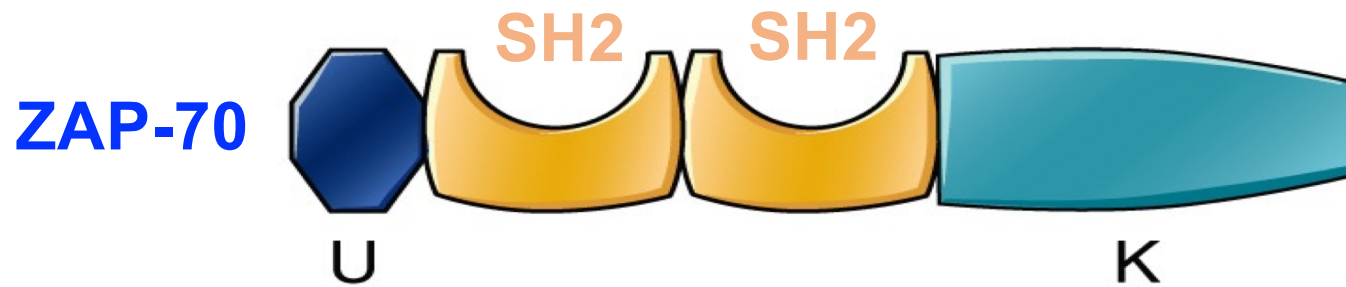
- **Tirosina C-terminale (negativa):** quando fosforilata mantiene la chinasi in uno stato inattivo e chiuso
- **Tirosina dominio chinasi (positiva):** sito di autofosforilazione
- Tirosin chinasi (regolatorie) come **p50 CSK** fosforilano la tyr C-terminale (inattivazione) → il dominio SH2 della chinasi lega la tyr C-terminale chiudendo il sito chinasi
- Fosfatasi come **CD45** defosforilano la tyr C-terminale (attivazione) → la chinasi si apre e si autofosforila



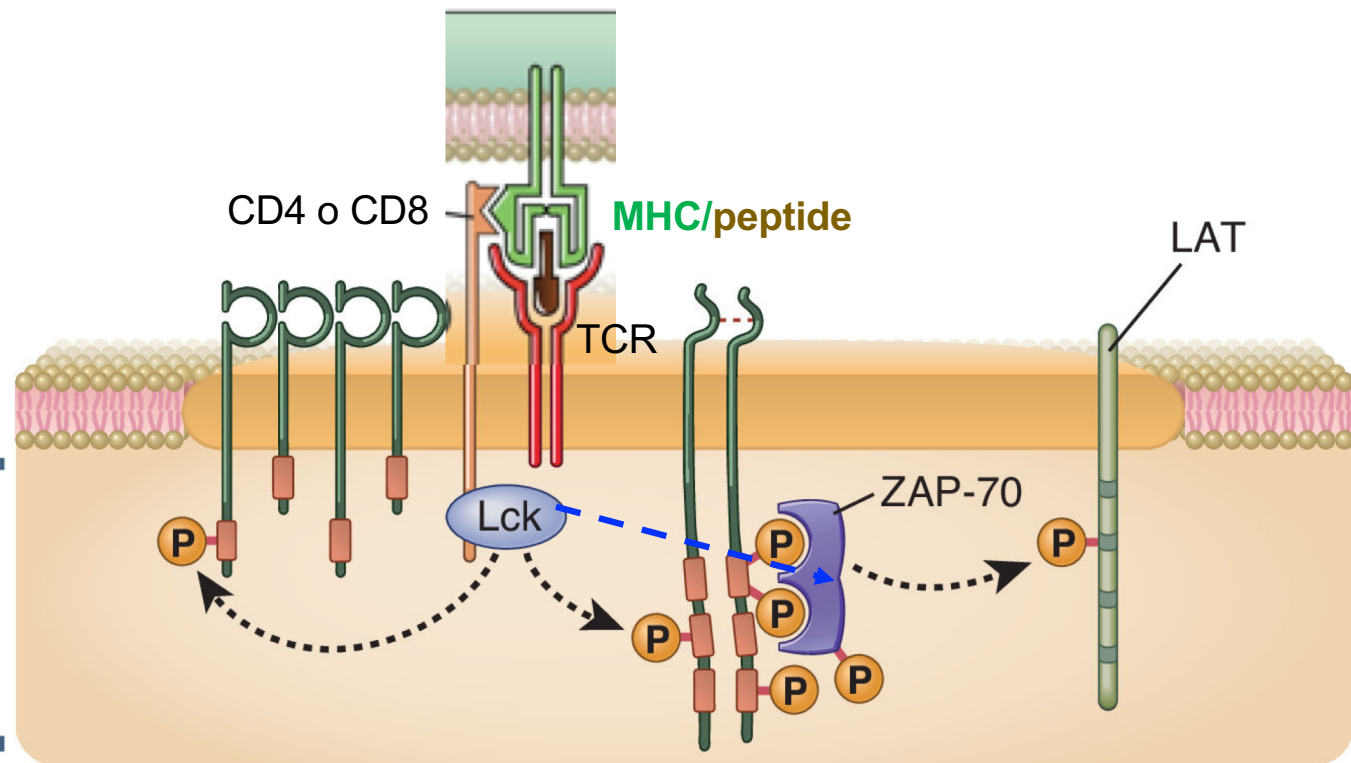
# Tyr chinasi della famiglia Syk



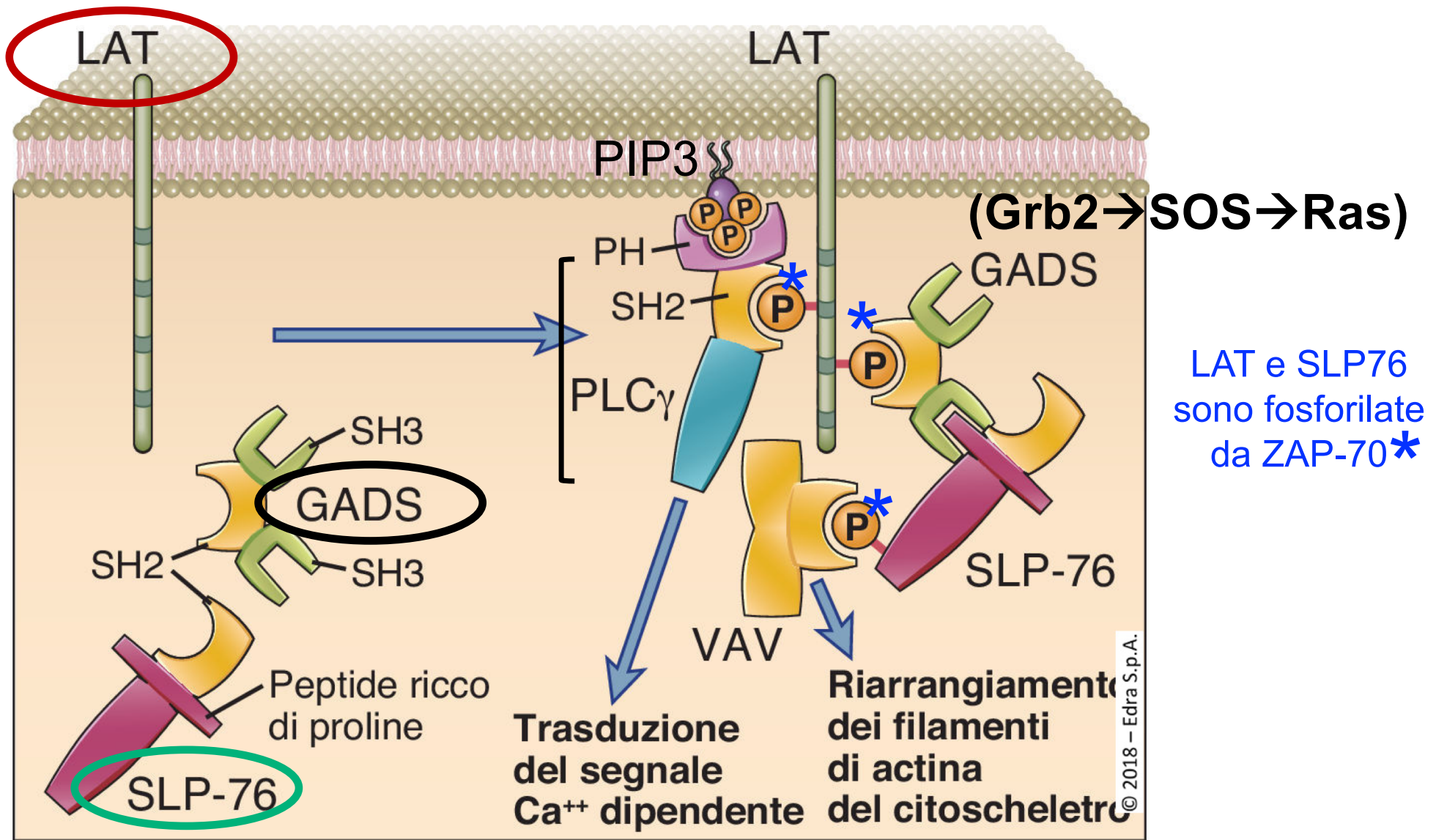
## Reclutamento ed attivazione di ZAP-70



ZAP-70 si lega alle fosfotirosine della catena  $\zeta$  e fosforila le proteine adattatrici, come LAT



# Proteine adattatrici coinvolte nell'attivazione linfocitaria



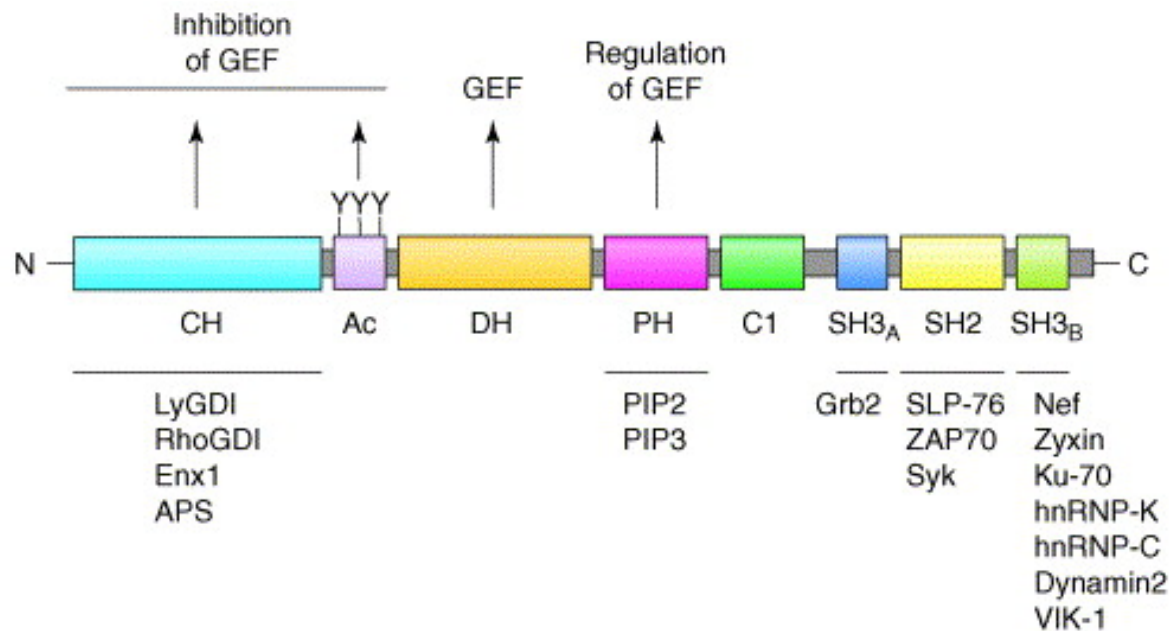
LAT= linker for the activation of T cells

SLP-76=SH2 domain-containing linker protein of 76 kD

GADS= Grb-2-related adaptor protein downstream of Shc

# VAV: fattori di scambio GDP-GTP (GEF) per RhoA, RAC1 e CDC42

ma anche proteine scaffold



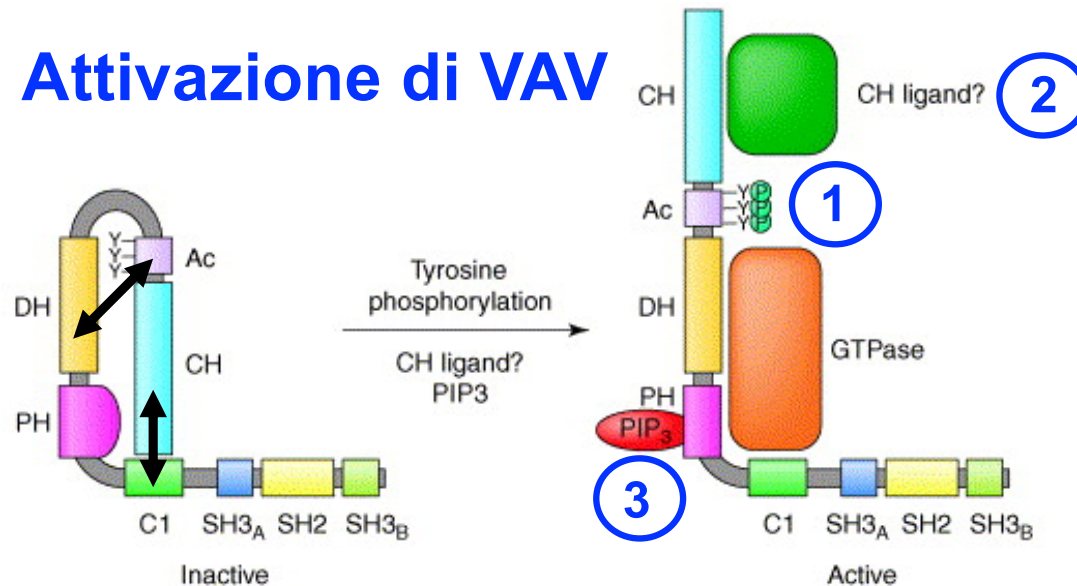
Nei mammiferi la famiglia comprende tre membri:

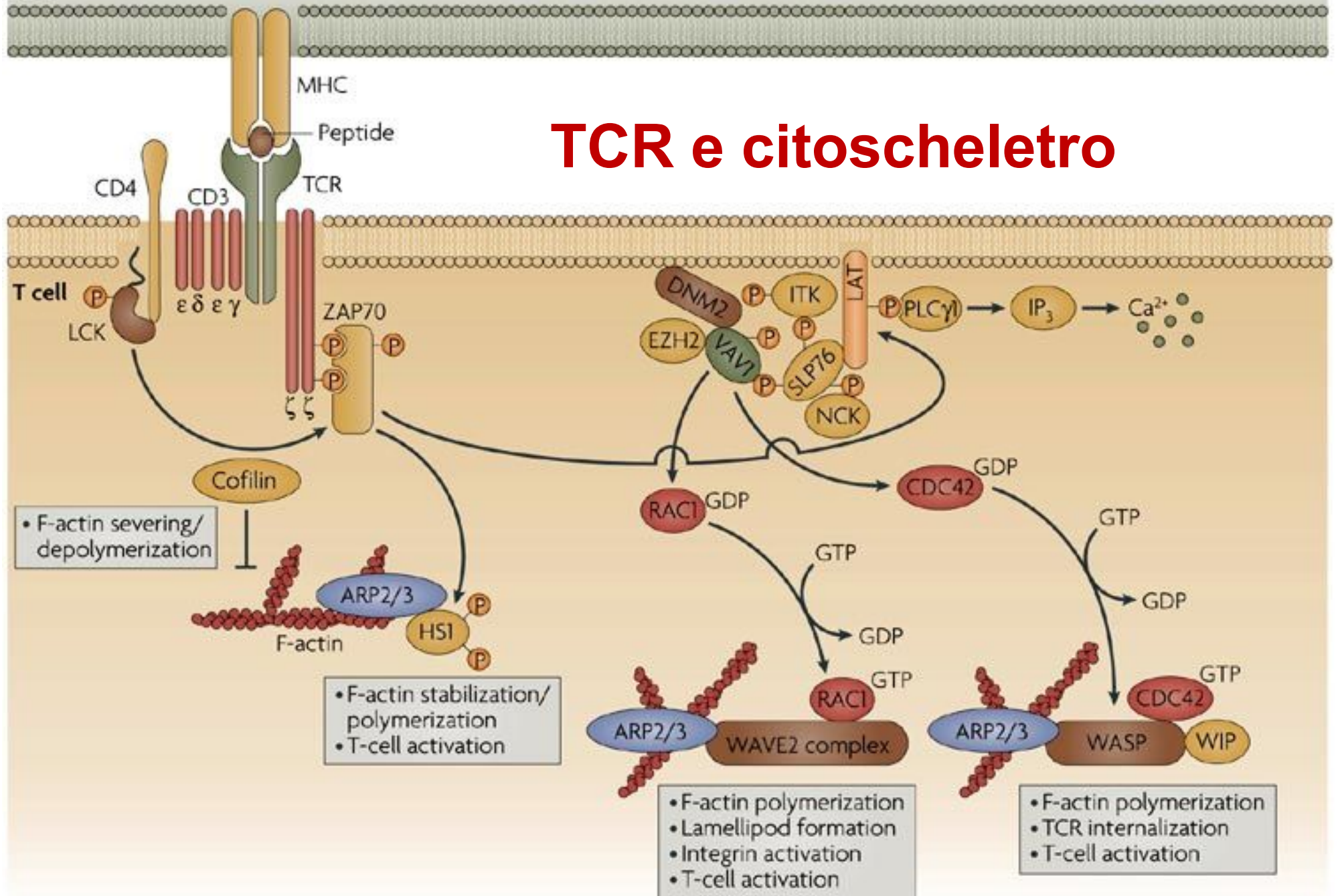
**VAV1** espresso nelle cellule ematopoietiche;

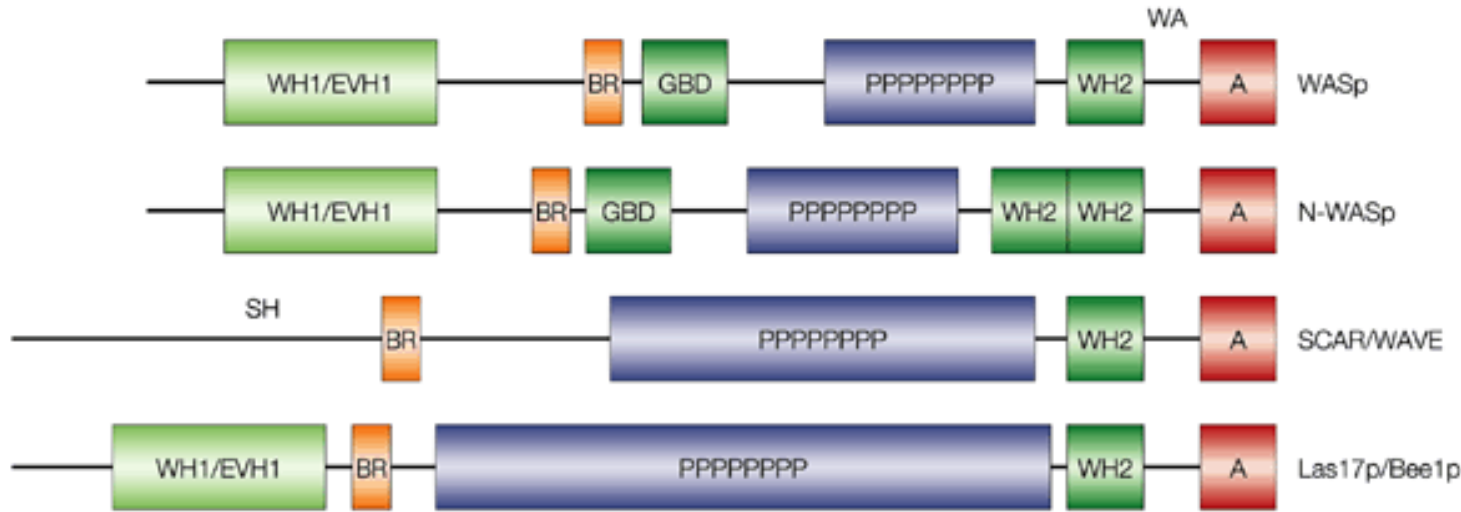
**VAV2** e **VAV3** espresse ubiquitariamente.

Queste proteine "signal transducer" sono implicate in molti processi che richiedono **riorganizzazione del citoscheletro** → **formazione sinapsi immunologica**

## Attivazione di VAV





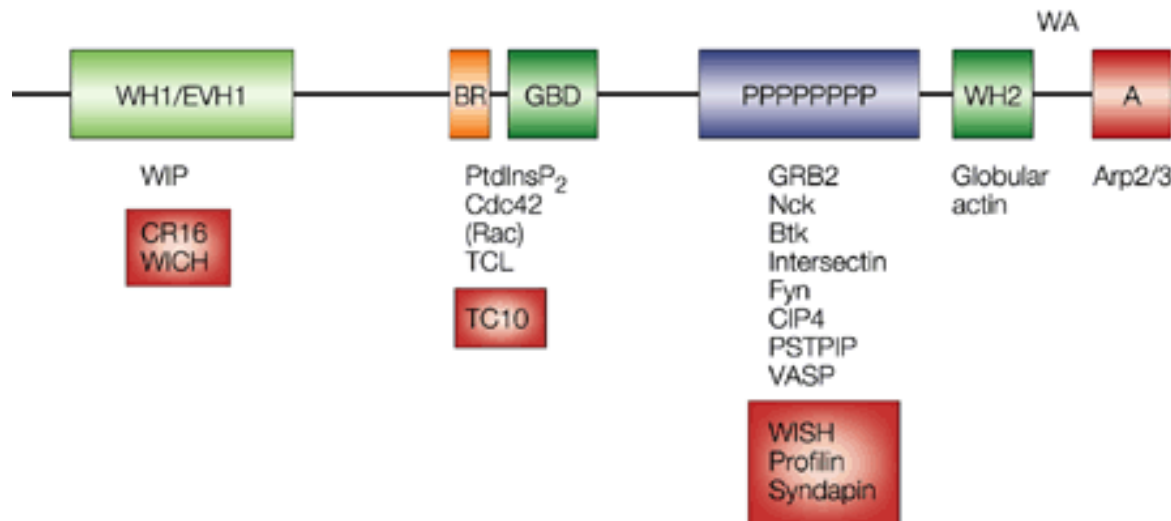


WASP è una proteina "scaffold" priva di attività catalitica che trasducendo segnali da altre proteine e membrane induce cambiamenti dinamici del citoscheletro di actina.

## WASP: espressa esclusivamente nelle cellule ematopoietiche

Mutazioni del gene WASP sono responsabili della sindrome di WISKOTT-ALDRICH (WAS; una immunodeficienza complessa)

## VCA



**WH1:** WASP homology 1

**BR:** basic region → PIP2

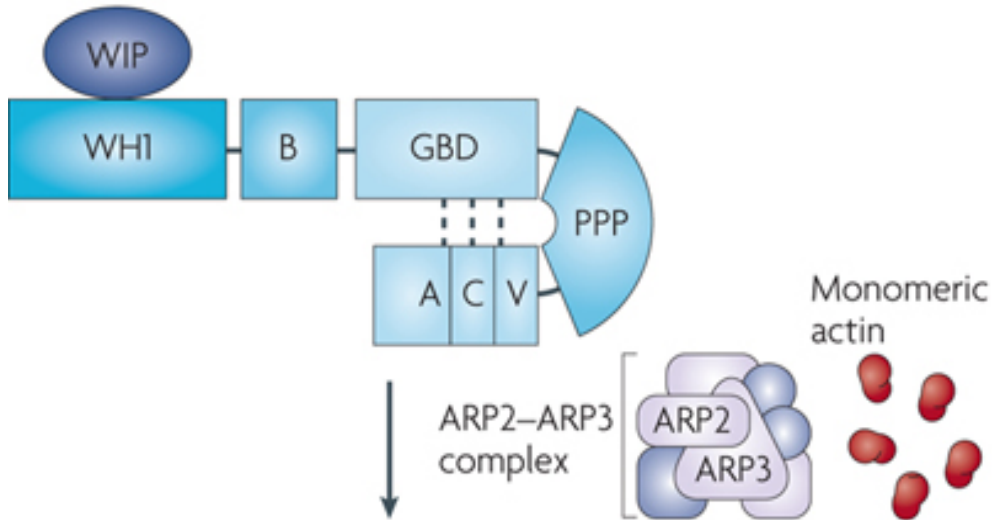
**GBD:** GTPase binding domain

**PPPPP:** polyproline region

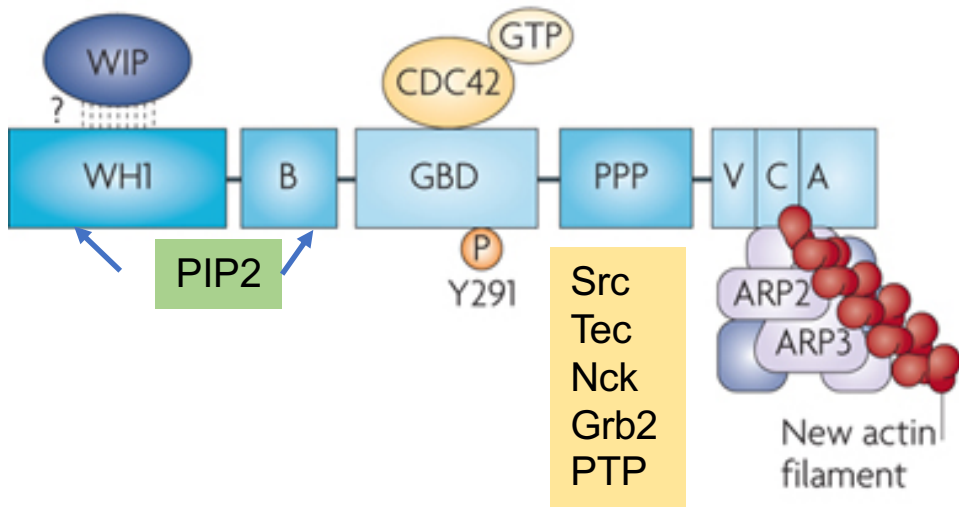
**VCA:** Verprolin-Central-Acidic region composto da **WH2** (WASP homology 2) e **A** (acidic region)

# Meccanismo di attivazione di WASP

Auto-inhibited WASP



Active WASP



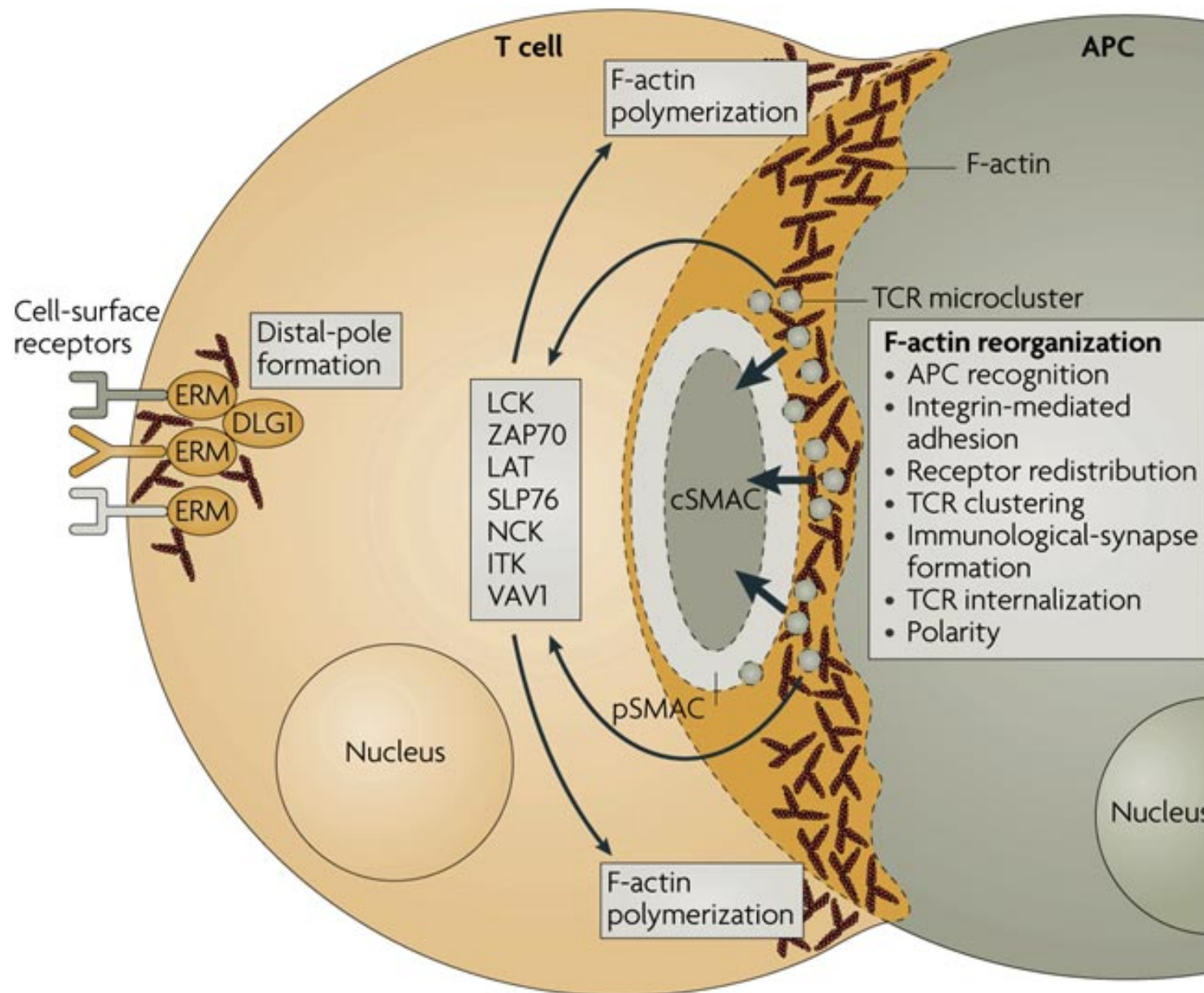
- Nel suo stato normale, **WASP** ha una **conformazione auto-inibita** in cui un'interazione intramolecolare tra i domini VCA e GBD impedisce il legame del complesso ARP2/ARP3 e dell'actina monomerica al terminale carbossilico.
- **CDC42** della famiglia delle Rho GTPase è il principale attivatore WASP legandosi al GBD provoca il rilascio allosterico del VCA dal GBD.

GTPase Superfamily



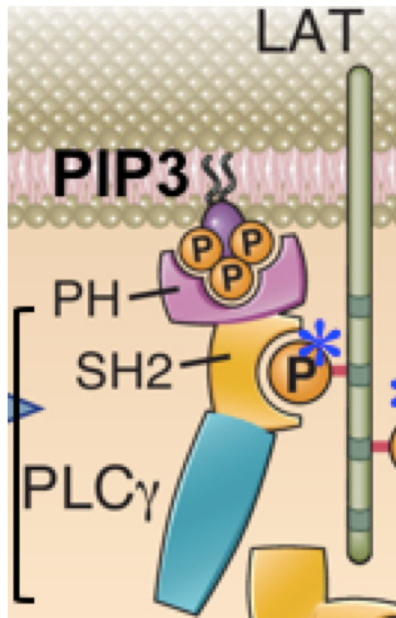
- **Binding del complesso ARP2/3** e polimerizzazione della F-actina.

# Sinapsi immunologica e riorganizzazione del citoscheletro

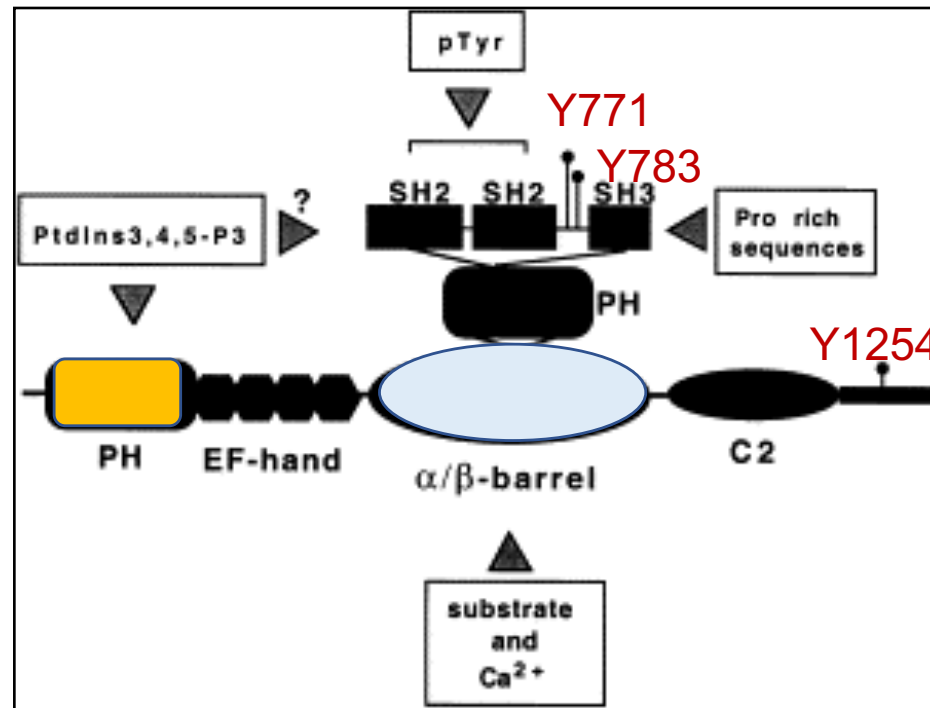




# PLC $\gamma$ nella trasduzione del segnale dei linfociti T



Il dominio **PH**  
lega **PIP3** (ed anche **PIP2**)



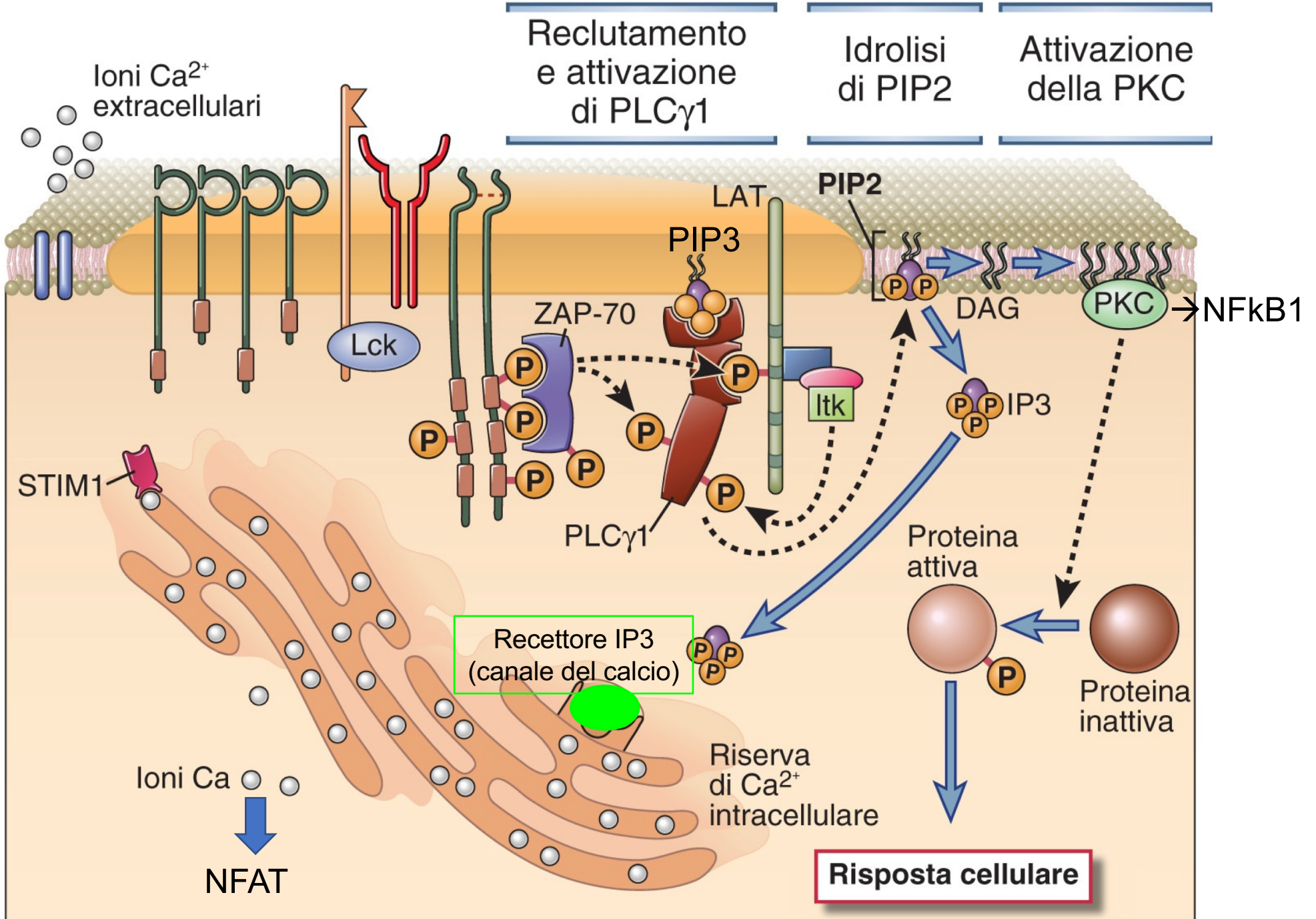
## PLC $\gamma$ 1 nelle cellule T

La fosforilazione di Y783 induce riorientamento del linker X-Y (autoinibitorio) e attivazione della PLC $\gamma$ 1

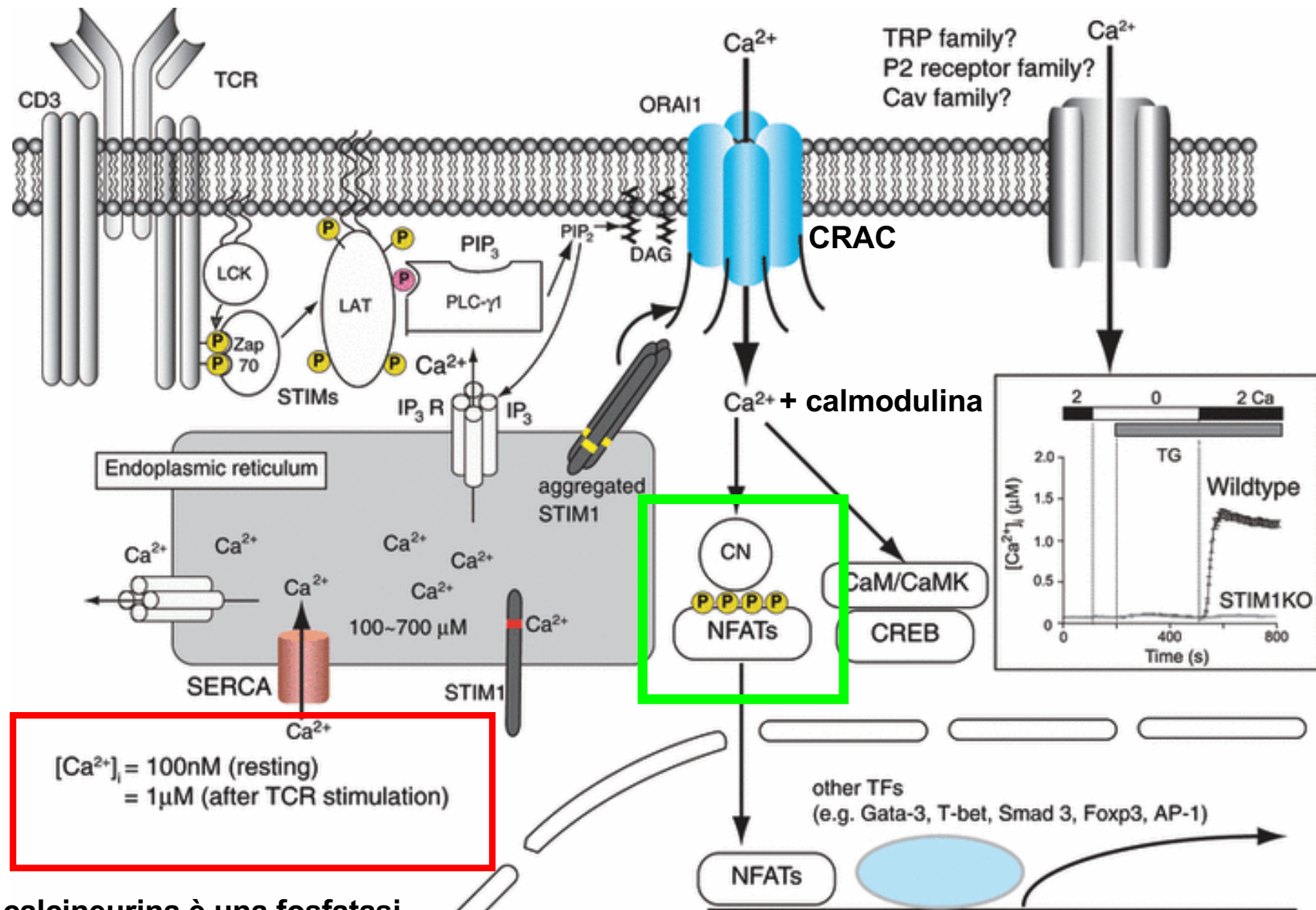
La fosforilazione della PLC $\gamma$ 1 è mediata da **Zap70**, **ITK** ed altre tirosin-chinasi della famiglia **Src**



# Reclutamento ed attivazione della PLC $\gamma$ 1

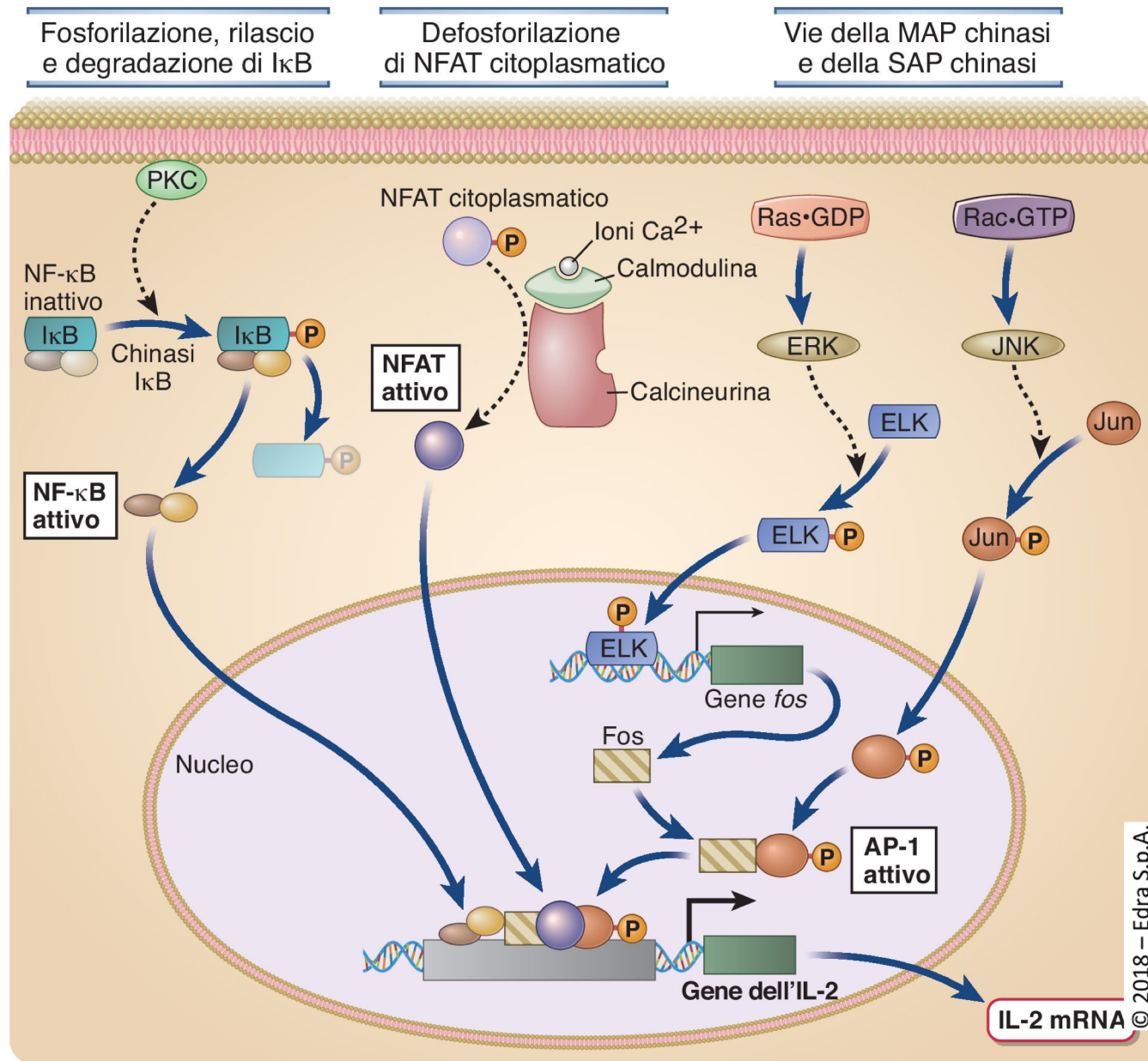


# IP3, Ca<sup>2+</sup> ed attivazione di NF-AT



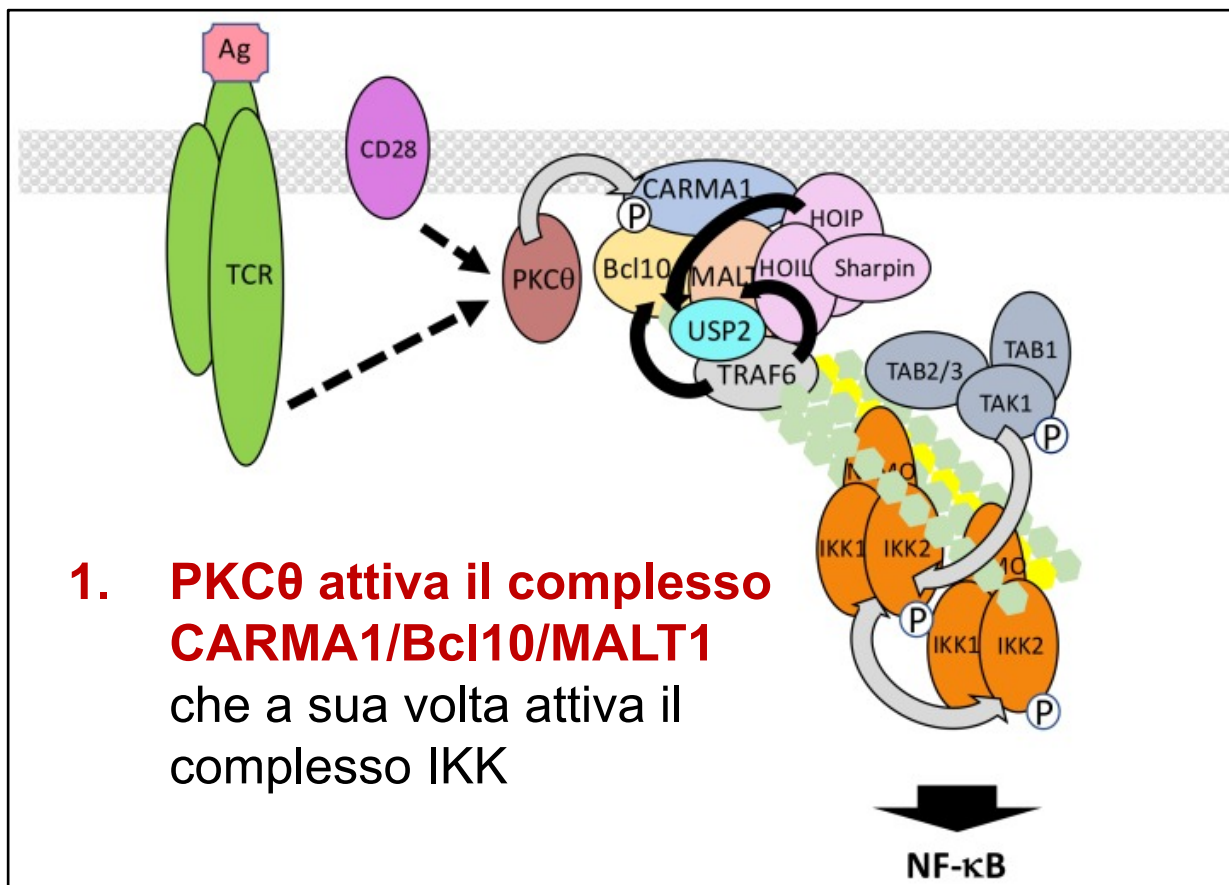
**CN:** calcineurina è una fosfatasi Ca<sup>++</sup> /calmodulina –dipendente che attiva NFAT

# Attivazione dei fattori di trascrizione nei linfociti T

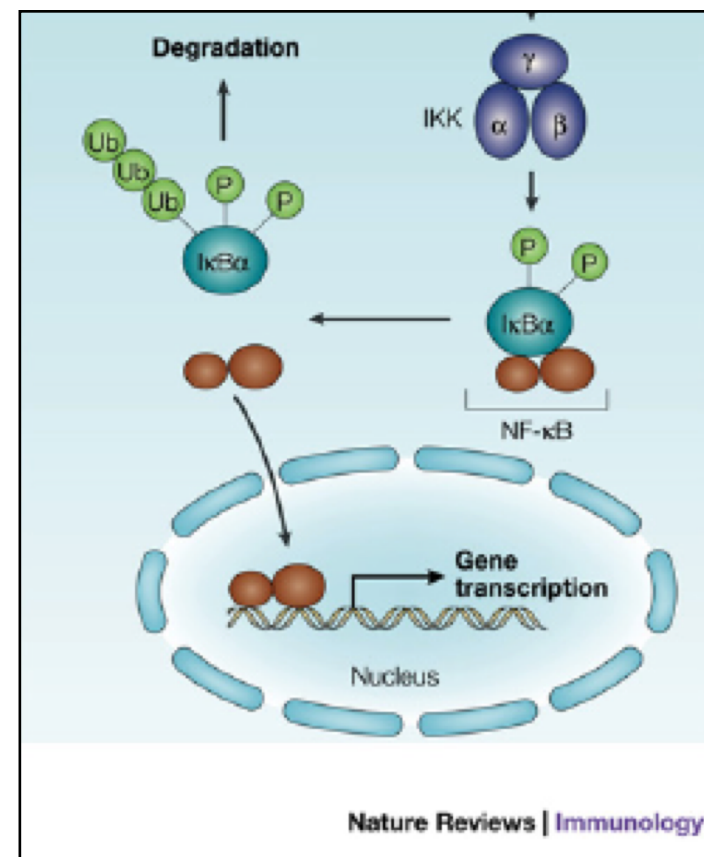


# TCR e attivazione di NF- $\kappa$ B1 (via canonica)

DAG  $\rightarrow$  PKC $\theta$



2. Il complesso IKK induce degradazione fosforilazione-dipendente di I $\kappa$ B, permettendo la traslocazione nel nucleo del dimero RelA/p50 (p65/p50).

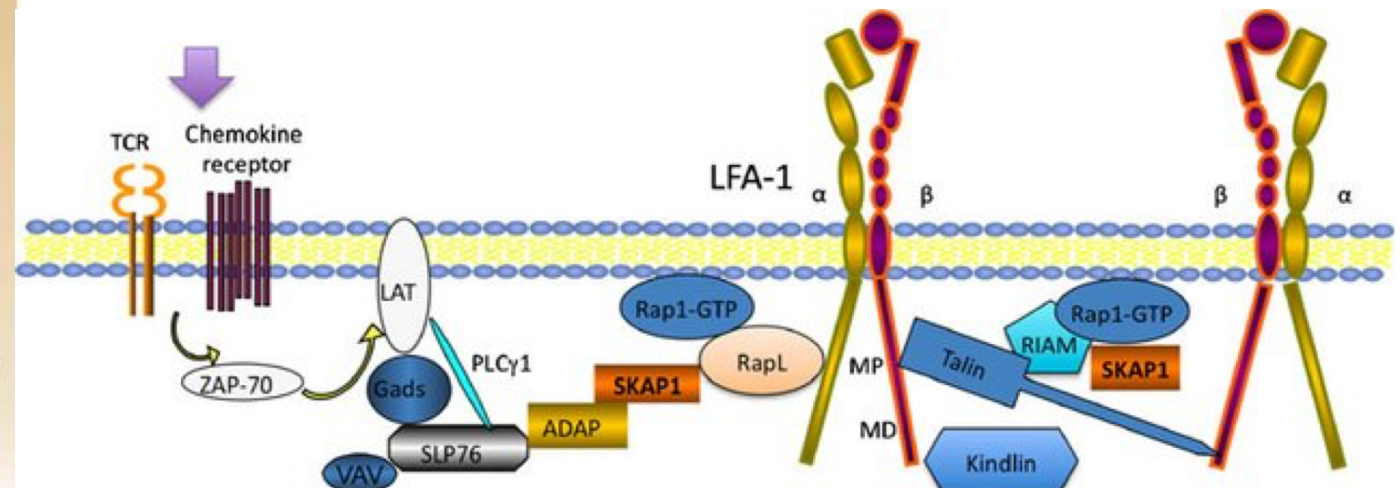
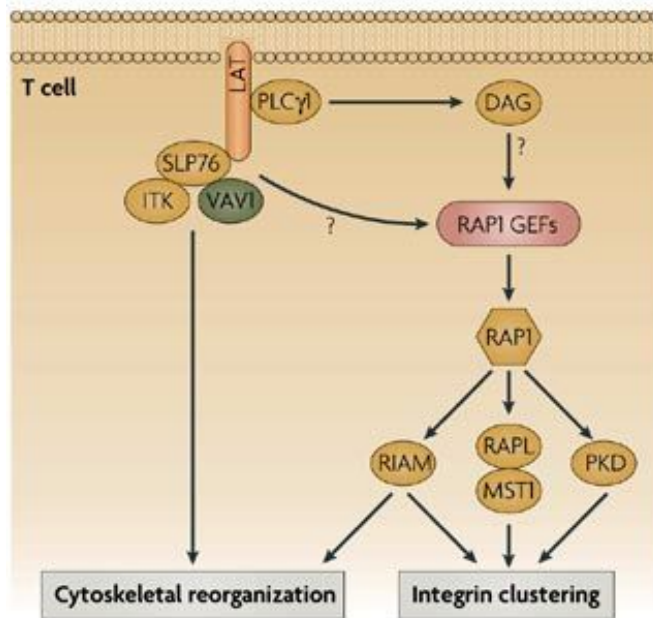


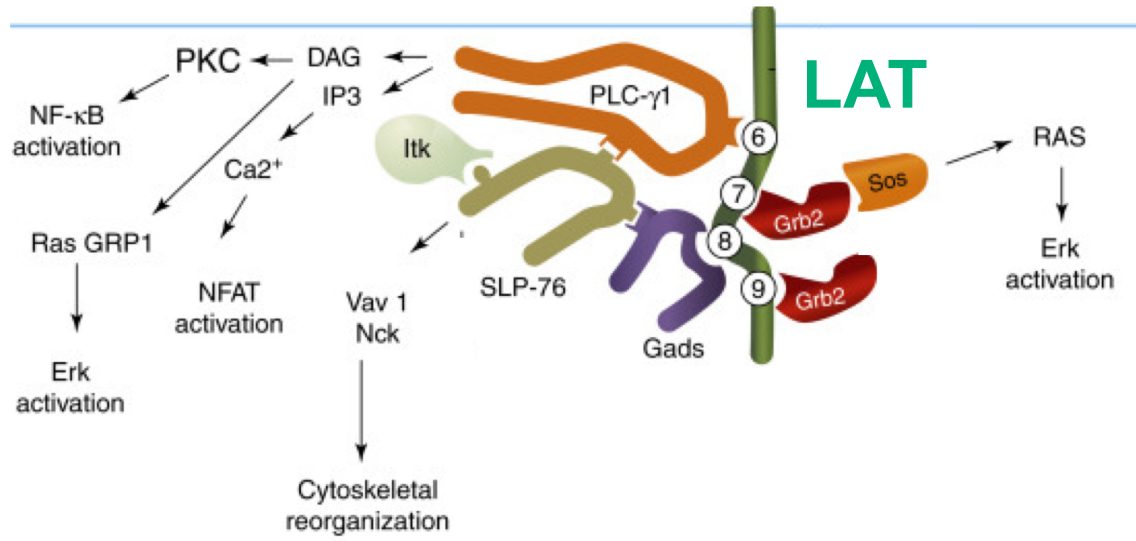
## Il TCR signalling aumenta l'affinita' delle integrine

La **PLC $\gamma$ 1** attivata dalla fosforilazione da parte di Zap70, ITK e altre chinasi idrolizza PIP2 portando alla formazione di IP3 e **DAG**.

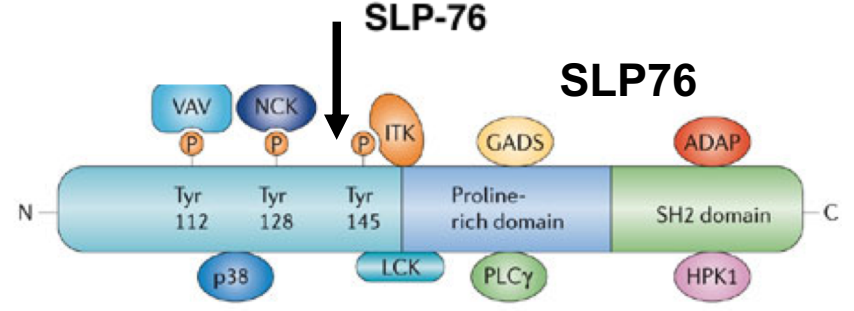
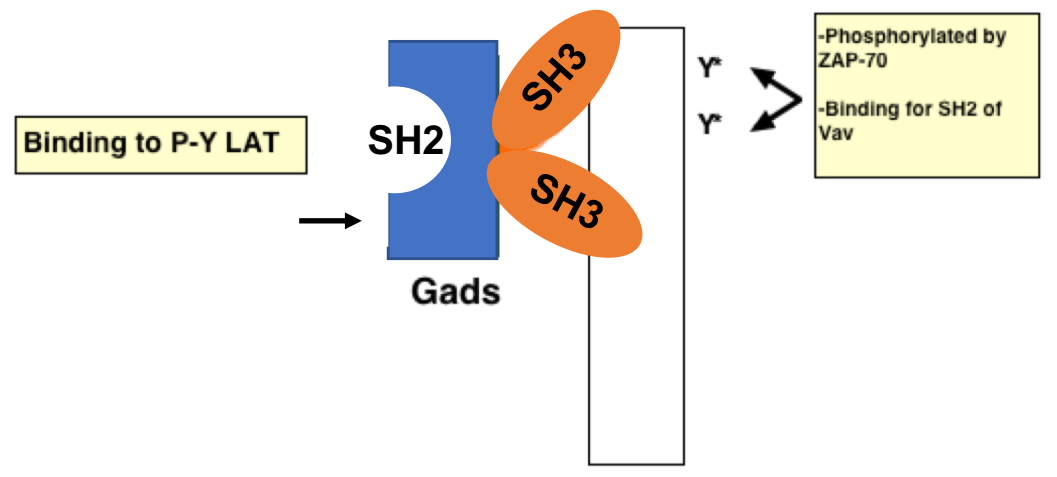
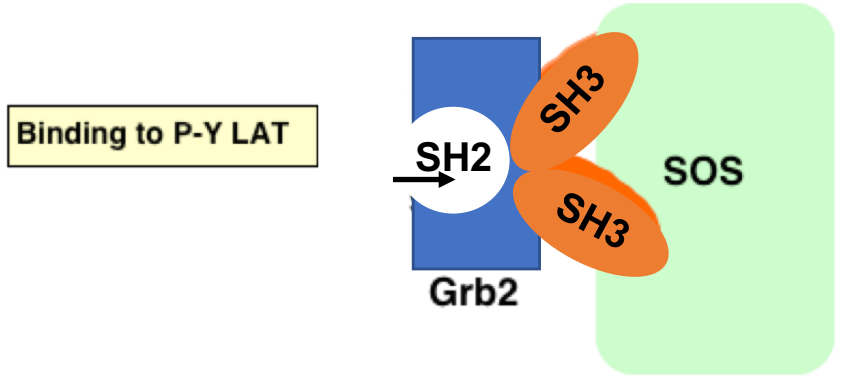
**DAG** attiva il **fattore di scambio GEF** di **RAP1** (proteina G) → **RAP1** lega **RIAM** favorendo il legame di LFA-1 alla talina e kindlina.

**LFA-1** tramite la **talina/Kindlina** prende contatto con il citoscheletro di actina e attraverso il meccanismo **inside-out** aumenta la sua affinita' di legame per ICAM1.

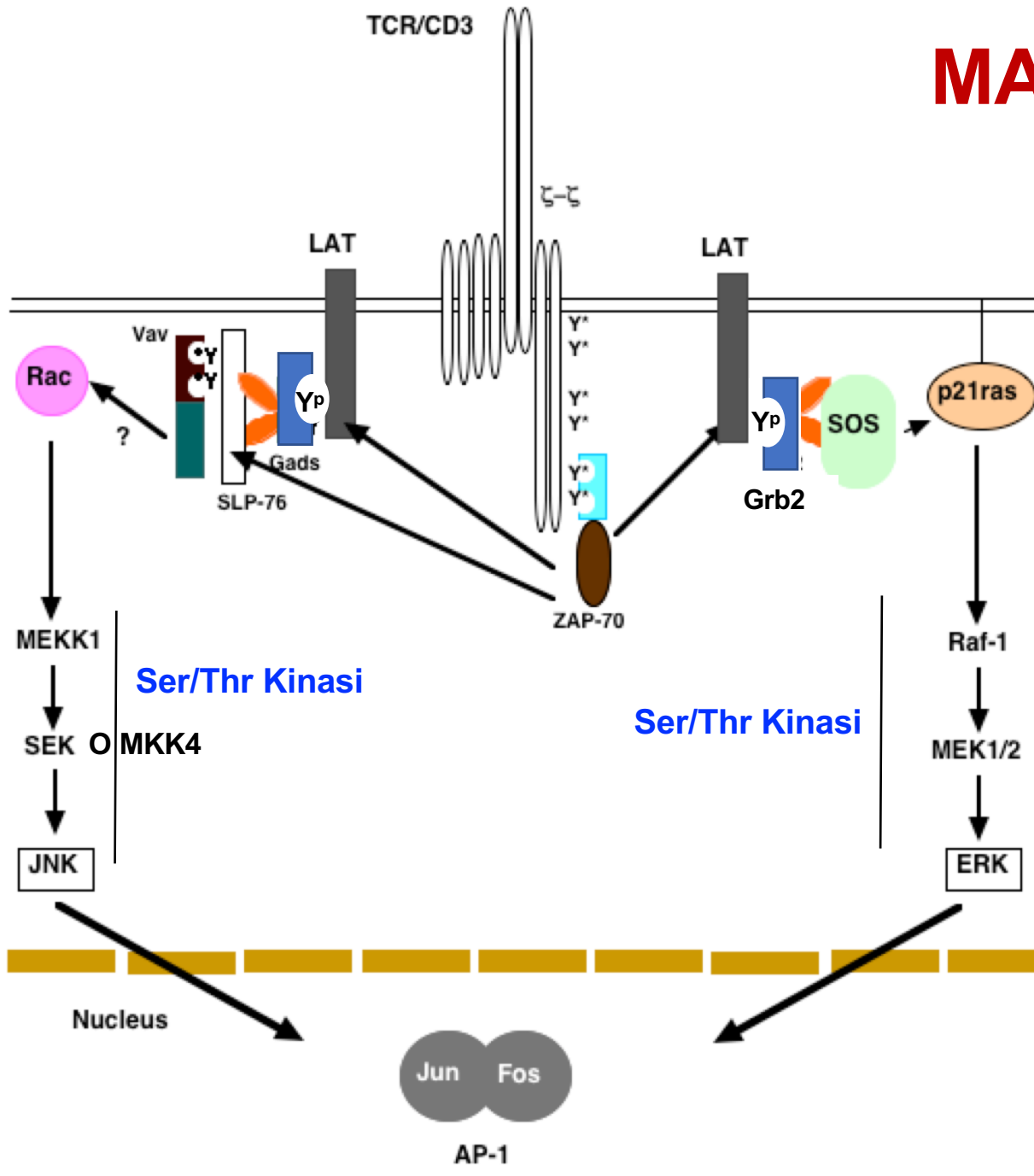




## Adattatori e GEFs nell'attivazione delle MAPK



# MAPK e AP1 attivo



## Attivazione ERK

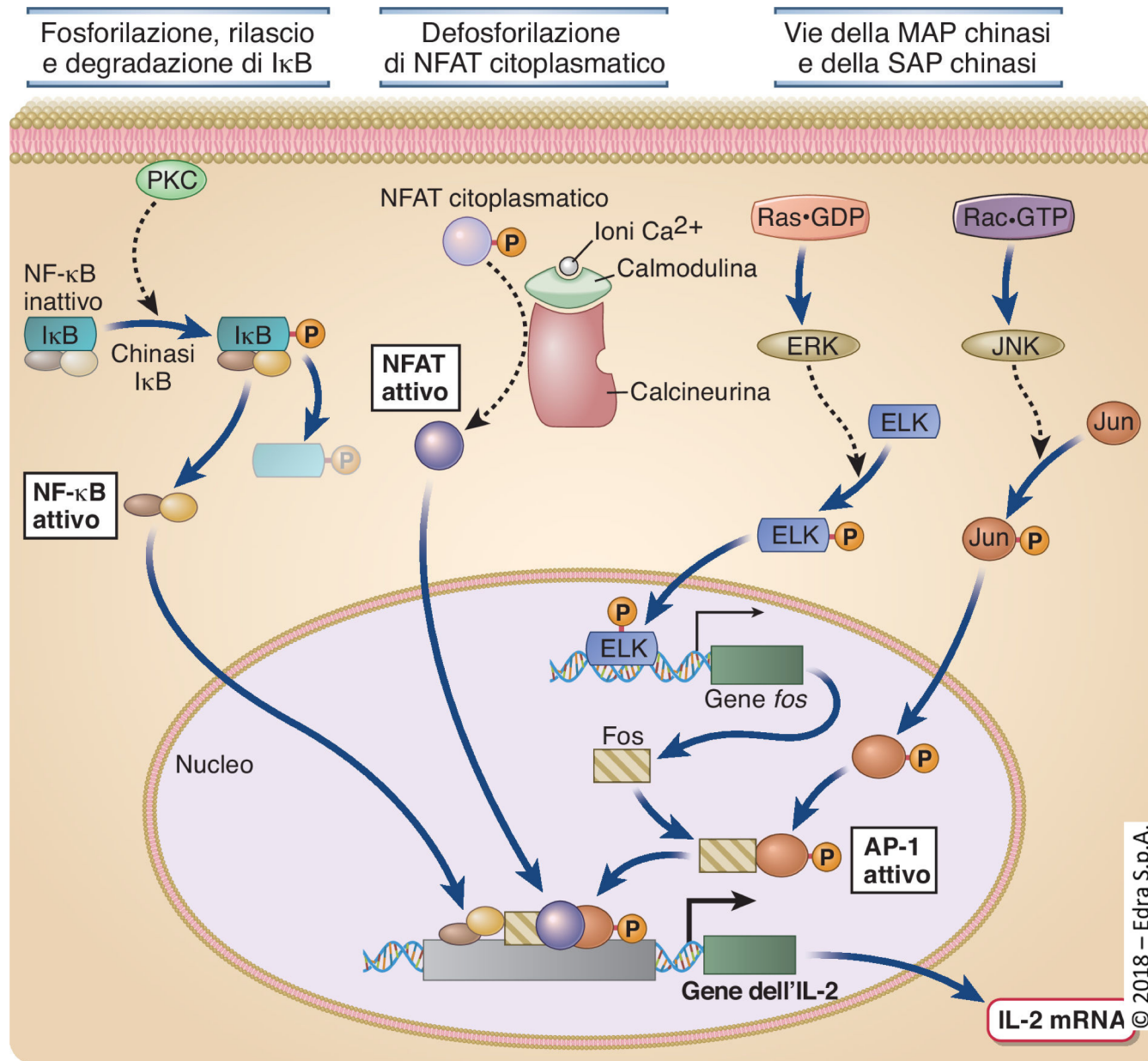
1. LAT fosforilato lega SH2 di Grb2 e porta SOS in membrana
2. SOS attiva Ras (proteina G) che lega e attiva Raf
3. Raf fosforila MEK che fosforila ERK che fosforila ELK
4. ELK induce trascrizione di Fos

## Attivazione JNK

1. LAT fosforilato lega Gads che è legato a SLP-76
2. ZAP70 fosforila SLP-76 che lega SH2 di Vav e lo porta in membrana
3. Vav attiva Rac1 (proteina G) che attiva MEKK1 (MAP3K)
4. MEKK1 fosforila e attiva SEK (MKK4) che attiva JNK
5. JNK fosforila Jun



# Attivazione dei fattori di trascrizione nei linfociti T



# La stimolazione via TCR induce la trascrizione del gene IL2

**IL-2** fattore autocrino di crescita e proliferazione dei linfociti T

Lega il recettore ad alta affinità costituito da **catena  $\alpha$  (CD25)** la cui trascrizione è indotta via TCR) e **catena  $\beta$  e  $\gamma$**  (catene costitutive)

La stimolazione del TCR induce la trascrizione sia dell'**IL-2** sia del **CD25**

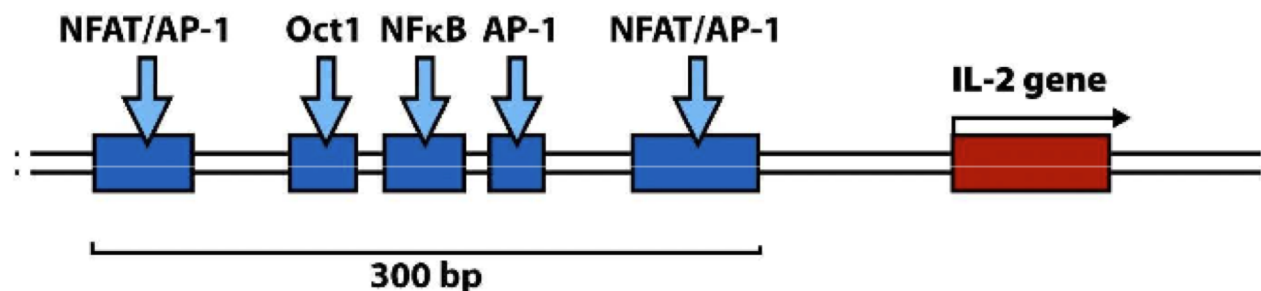
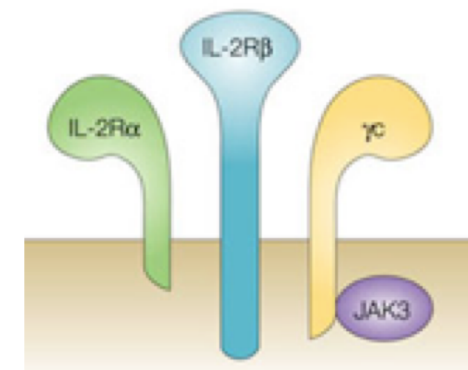
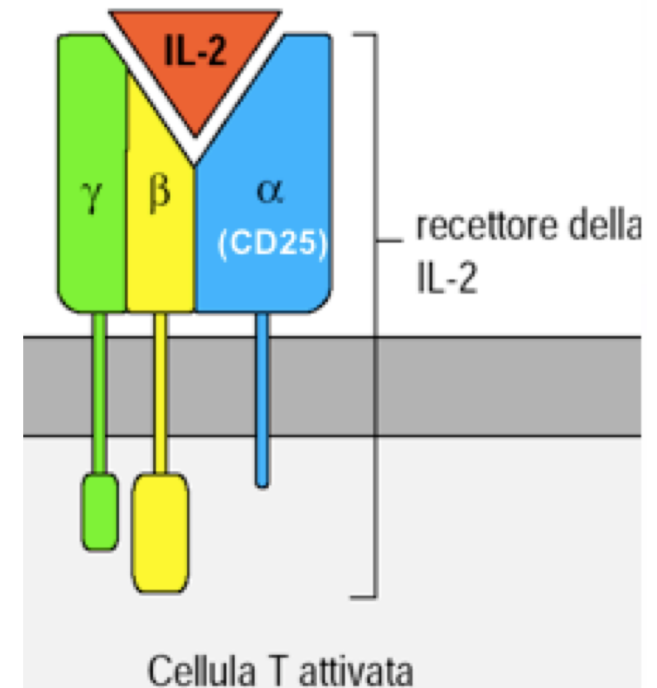


Figure 6-23 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Catena  $\gamma$  comune ai recettori per **IL4, IL7, IL9, IL15, IL21, IL27**