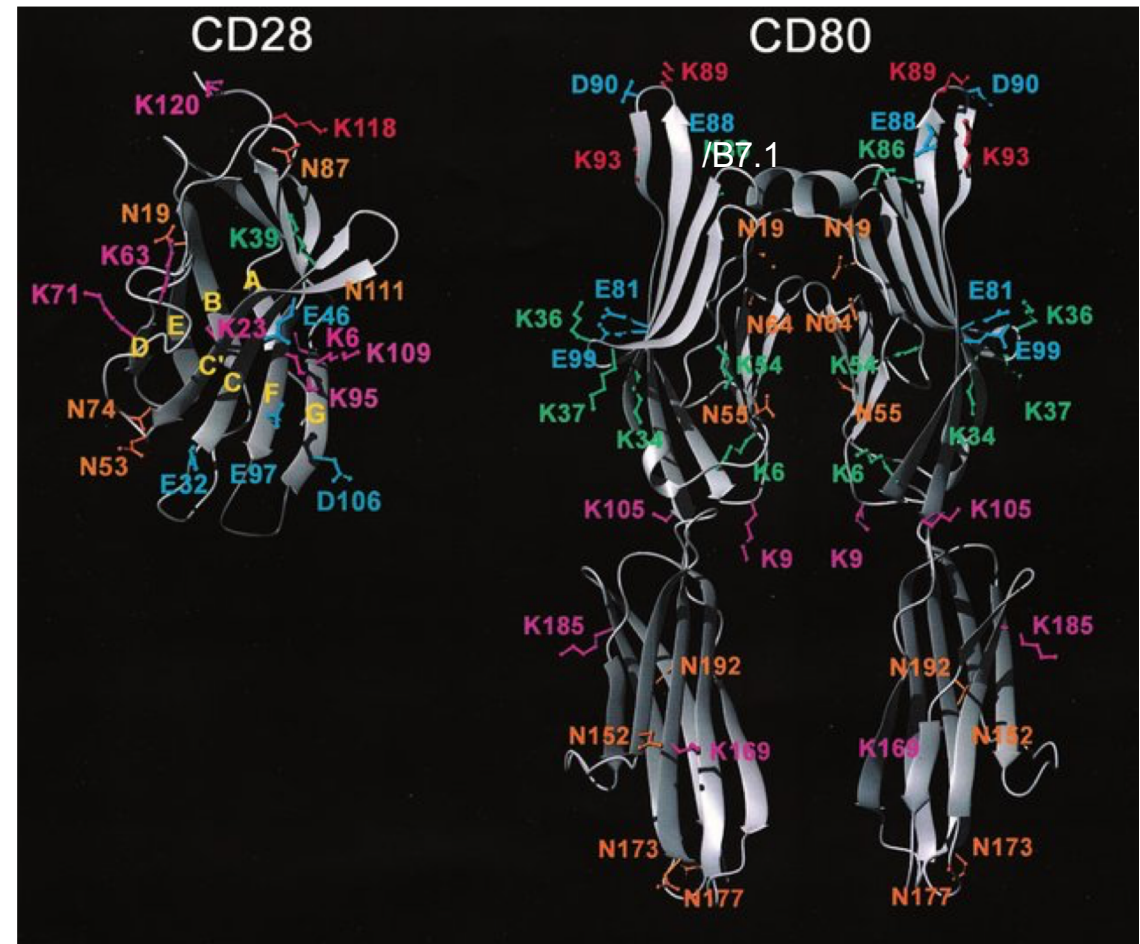
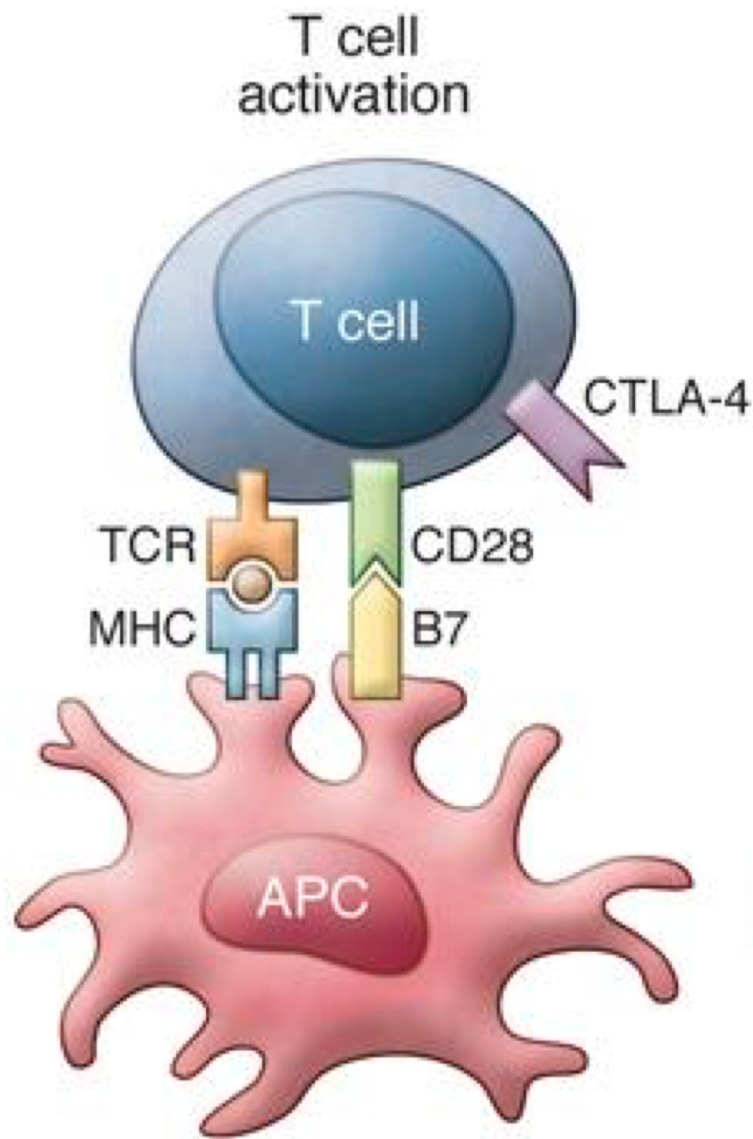
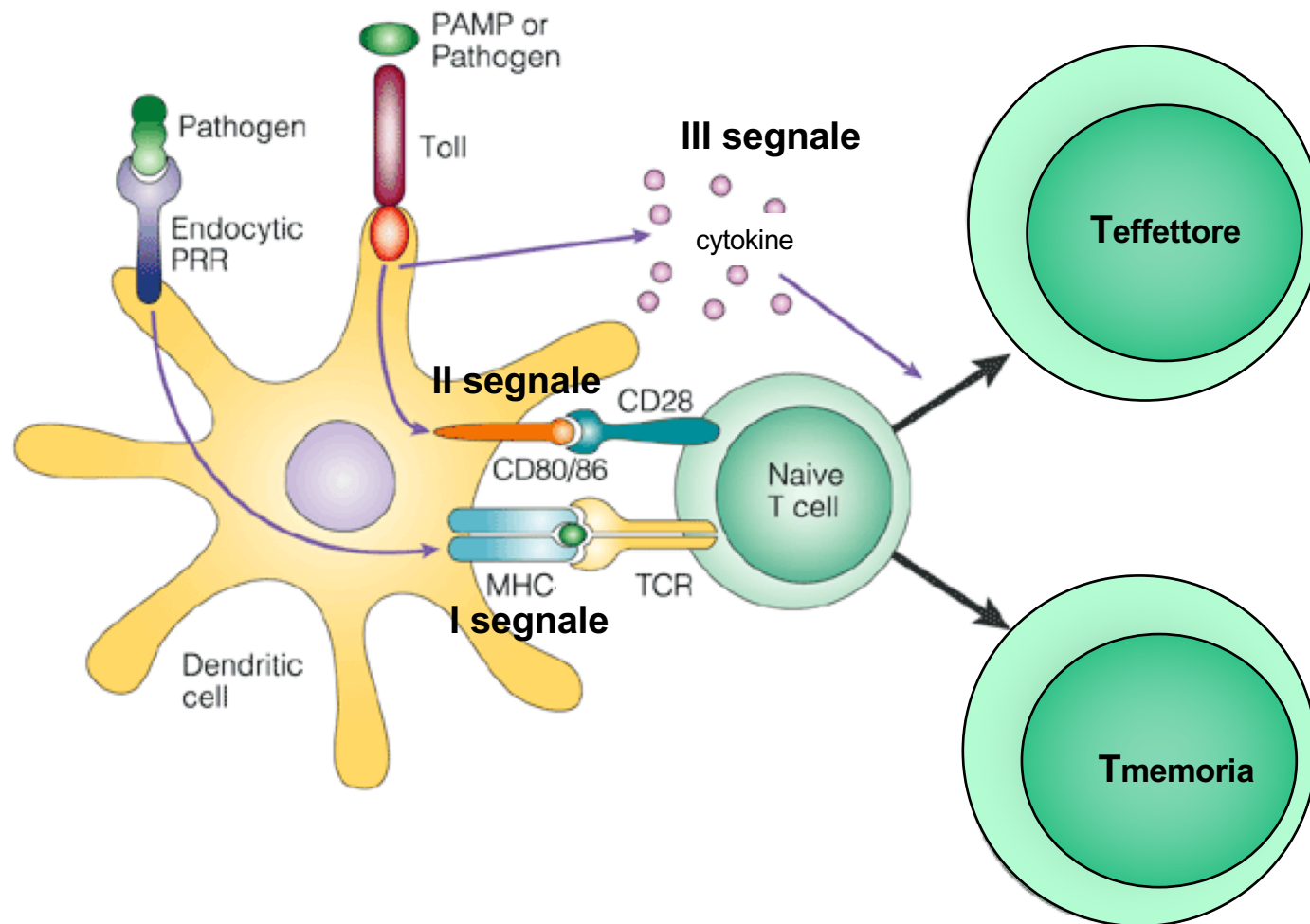


Molecole e vie di costimolazione



Riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T naive

Ruolo degli adiuvanti nei vaccini

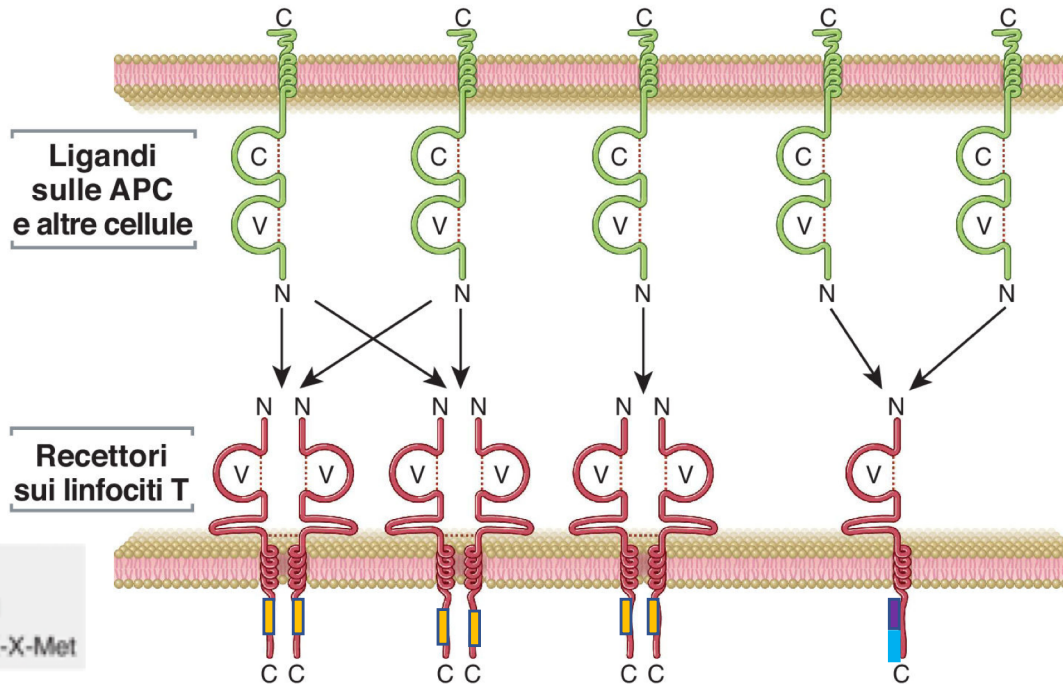


- Tre segnali servono ad un linfociti T naive per l'attivazione, proliferazione e differenziamento in linfocita T effettore e della memoria.
- L'assenza del secondo segnale (per mancata attivazione dell'immunità innata/infiammazione) determina **anergia** (mancata responsività funzionale).

Membri delle famiglie CD28 e B7

Molecole Costimolatorie/ (coinibitorie)

Espressione	DC; macrofagi, linfociti B		DC; macrofagi, linfociti B, altre cellule	DC; macrofagi, linfociti B; cellule endoteliali epiteliali e tumorali (solo PD-L1)	
Nome	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	ICOS-L (CD275)	PD-L1 (B7-H1, CD274)	PD-L2 (B7-DC, CD273)



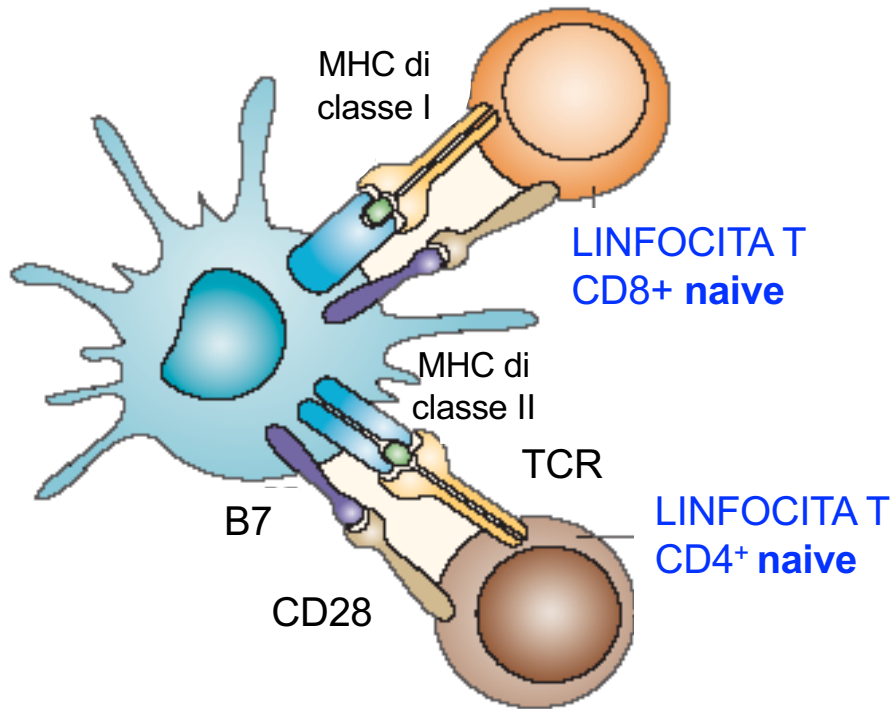
Nome	CD28	CTLA-4	ICOS	PD-1
Espressione sui linfociti T	Linfociti T naïve	Linfociti T regolatori e T linfociti attivati	Linfociti T attivati; linfociti T helper follicolari (T _{FH})	Linfociti T attivati
Funzione principale	Attivazione linfociti T naïve; attivazione della risposta immunitaria	Inibizione attivazione linfociti T Recettore inibitorio	Generazione di linfociti T helper follicolari	Recettore inibitorio Inibizione dell'attivazione T linfocitaria (soprattutto dei linfociti T effettori)

Recettori Costimolatori/ (coinibitori)

Membri della famiglia CD28

Tipo cellulare	Molecole costimolatorie (B7-1 e B7-2)
Cellule dendritiche	Costitutiva: aumenta con maturazione, IFN- γ e CD40/CD40L
Macrofagi	Indotta da TLR, IFN- γ e CD40/CD40L
Linfociti B	Indotta da CD40/CD40L (linfociti T) e BCR
Cellule endoteliali	Bassa; forse inducibile
Cellule epiteliali	Nessuna

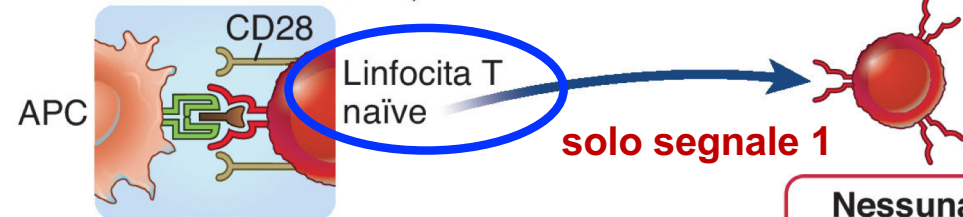
CD28 ed il modello (ipotesi) dei “due segnali”



Riconoscimento dell'antigene

Risposta T

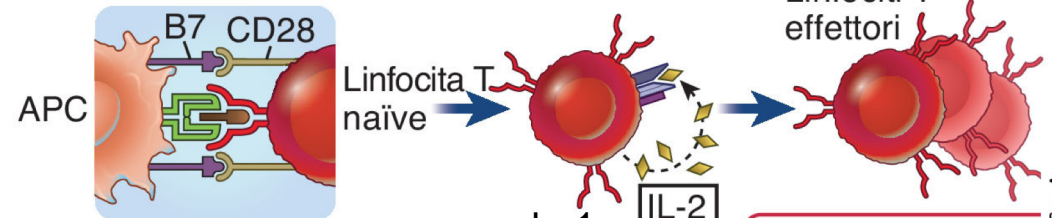
APC a riposo (che manca di molecole costimolatorie)



Nessuna risposta o tolleranza

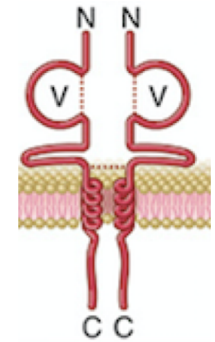
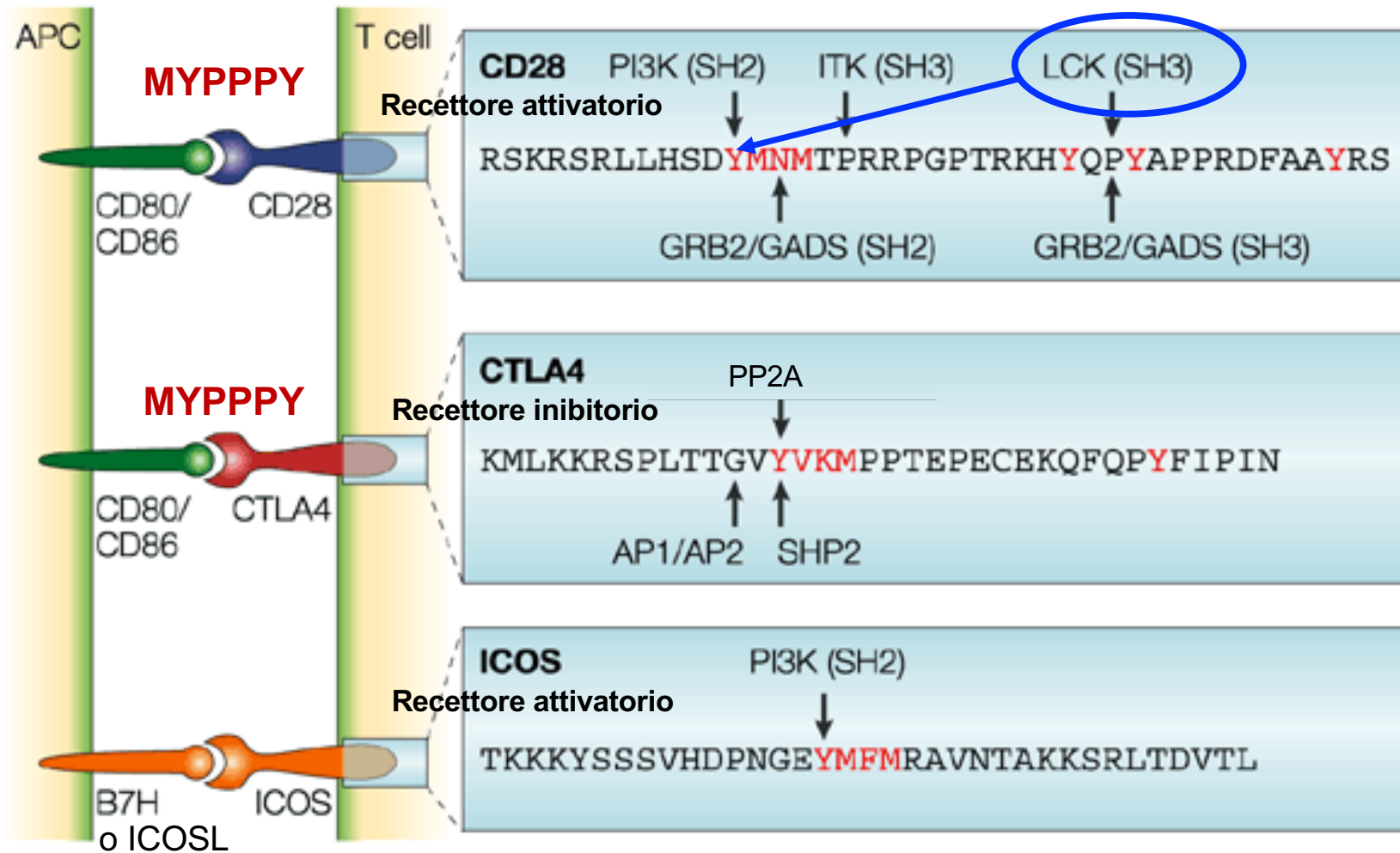
ANERGIA

Microbi e risposte innate aumentano l'espressione delle molecole costimolatorie delle APC



Sopravvivenza, proliferazione e differenziament dei linfociti T

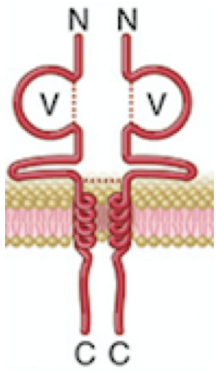
Comparazione tra CD28, CTLA4 e ICOS



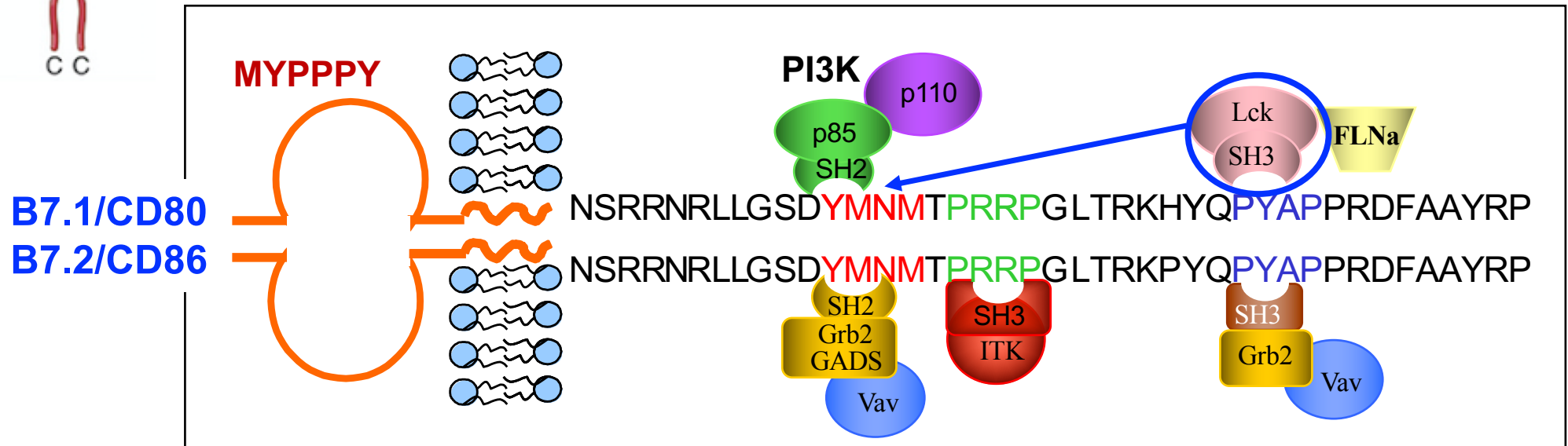
Chr 2q33

Nature Reviews | Immunology

MYPPPY: sequenza consenso presente nel dominio extracellulare del **CD28** e **CTLA4** coinvolta nell'interazione con B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86)



Struttura della molecola CD28



CD28 recluta:

Class 1A PI3K che fosforila PIP2 generando PIP3 e quindi il sito di legame per il dominio PH di **PLC γ** , **Itk** e per **PDK1** e **Akt** con attivazione di quest'ultimo.

Vav1: GEF per Rac1 (attivazione JNK) e Cdc42 (polimerizzazione actina)

FLNA (filamina A): coadiuva la polimerizzazione dell'actina e la stabilizza

Effetti della co-stimolazione mediata da CD28

- **Rimodellamento del citoscheletro di actina** (tramite attivazione di **Vav**) e sua stabilizzazione ad opera della filamina
- **Attivazione PI3K/AKT**: regolazione crescita, metabolismo e inibizione dell'apoptosi (over-espressione di Bcl-X_L e di Bcl-2; repressione dell'espressione geni pro-apoptotici)
- **Attivazione selettiva di NF-κB** (blocco dell'anergia e espressione di citochine)
- Potenziamento di **NF-AT, AP1, NF-κB** (espressione di IL-2 e CD25, IFN γ , IL-4 etc)

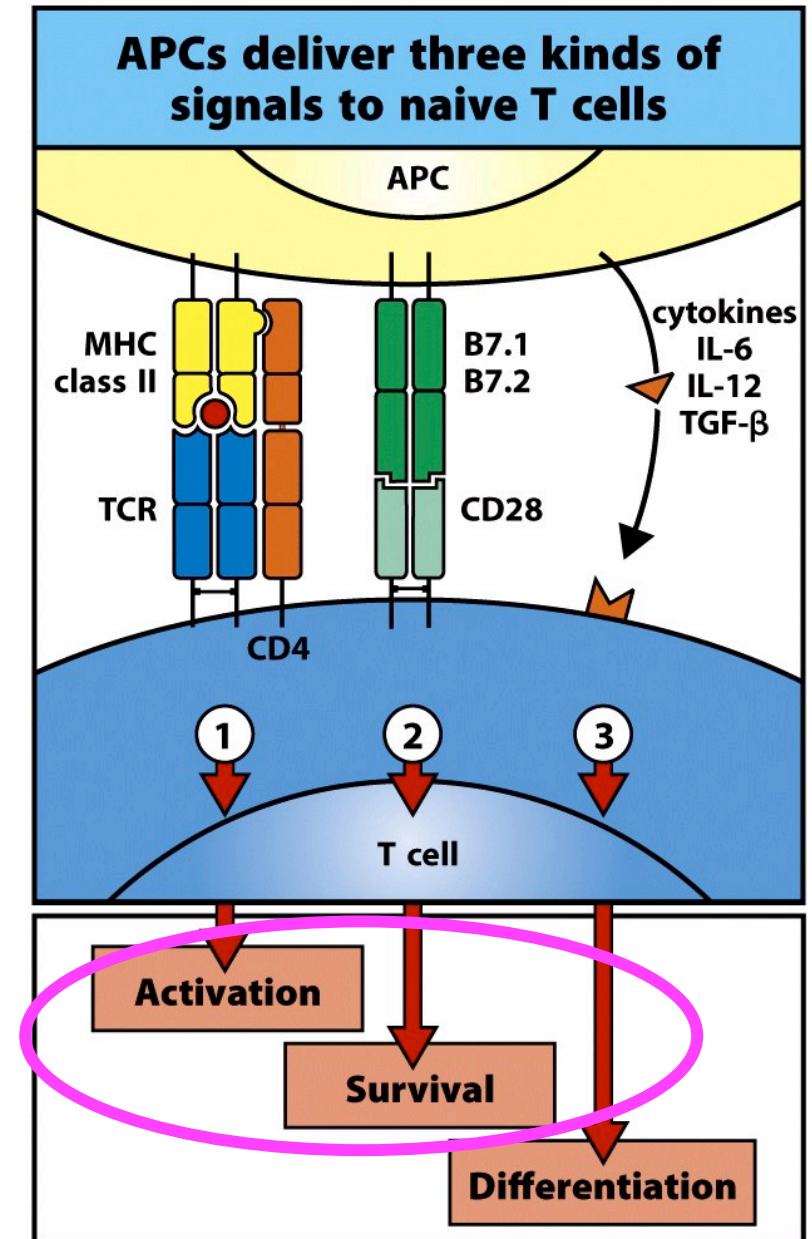
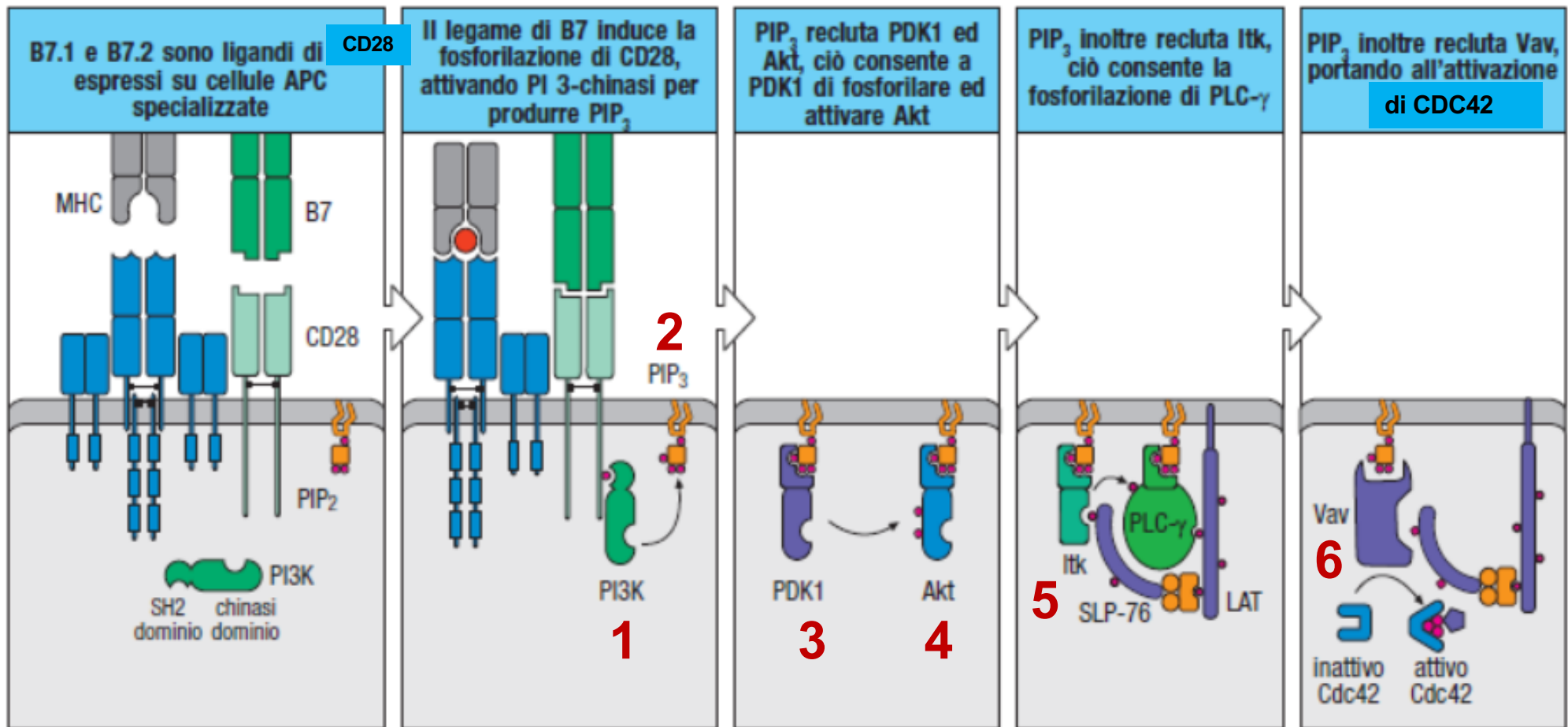


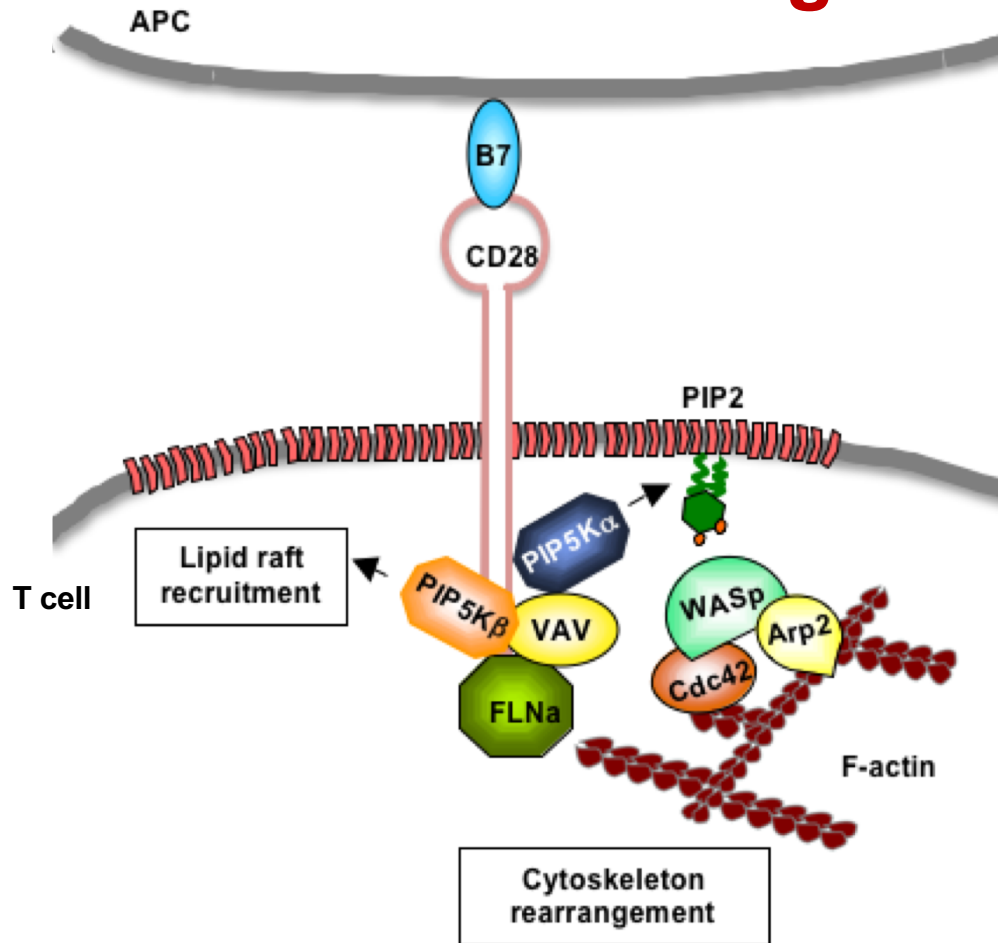
Figure 8-19 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

CD28 trasduce segnali che potenziano le vie di trasduzione del segnale indotte via TCR



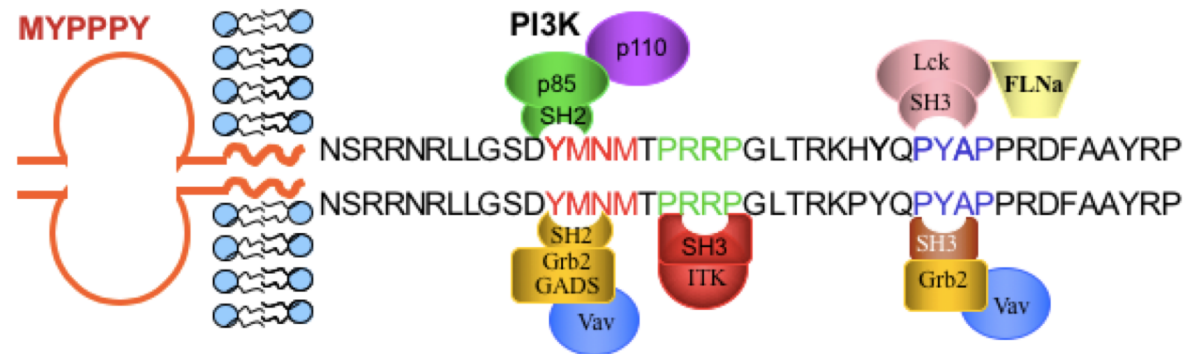
I ligandi di CD28 ovvero CD80 e CD86 sono espressi solo su cellule specializzate presentanti l'antigene. L'impegno di CD28 induce la sua fosforilazione in tirosina che attiva la **(1) PI3K** con successiva produzione di **(2) PIP3** da PIP₂ che recluta diversi enzimi tramite il loro dominio PH portandoli insieme ai loro substrati nella membrana. PIP₃ recluta la proteina chinasi-fosfoinositide dipendente **(PDK1) (3)** che fosforila la protein chinasi **Akt (4)** viene attivata e induce sopravvivenza cellulare e stimola il metabolismo cellulare. Inoltre, il reclutamento della chinasi **Itk (5)** sulla membrana è fondamentale per la piena attivazione di **PLCγ**. PIP₃ recluta anche **VAV (6)** portando all'attivazione di CDC42 e inducendo polimerizzazione dell'actina.

CD28 e riarrangiamento del citoscheletro

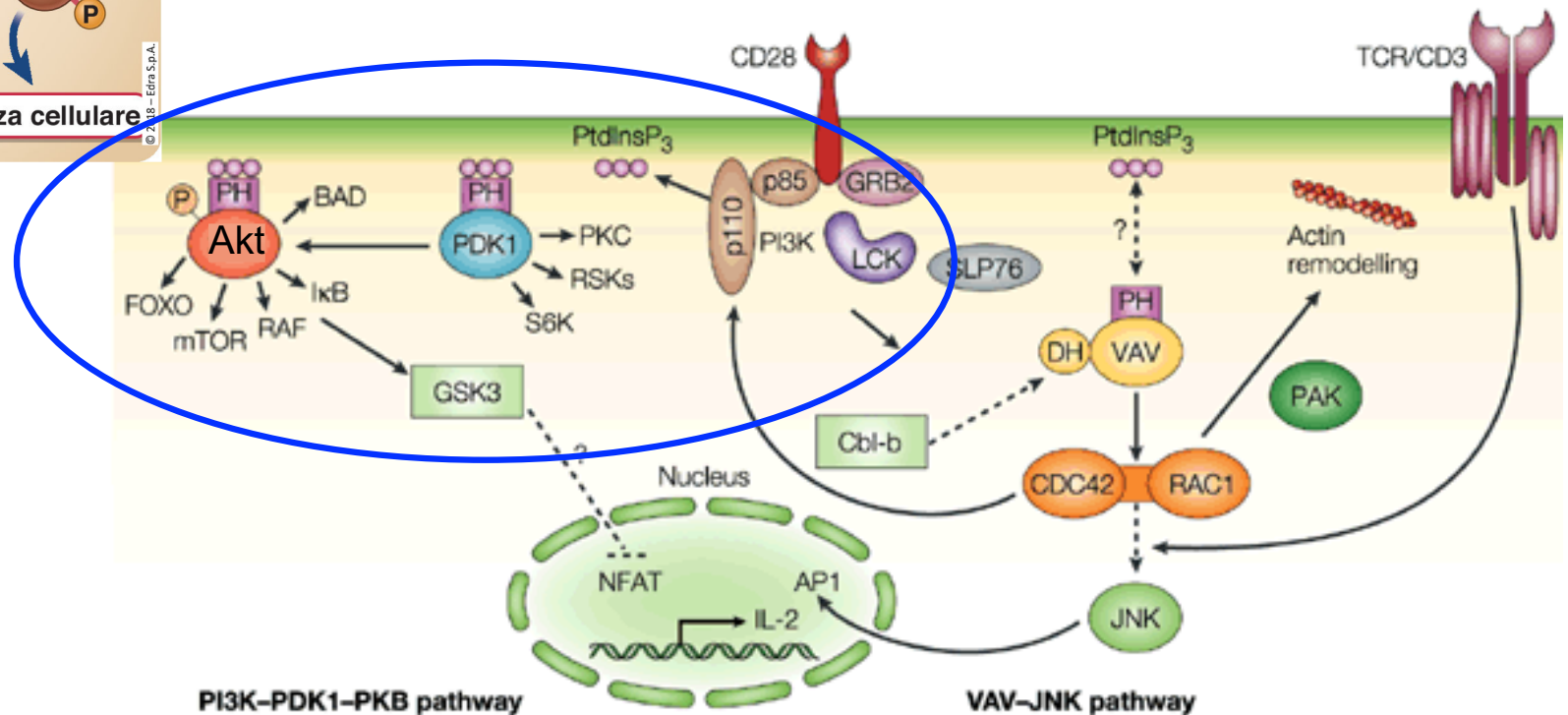
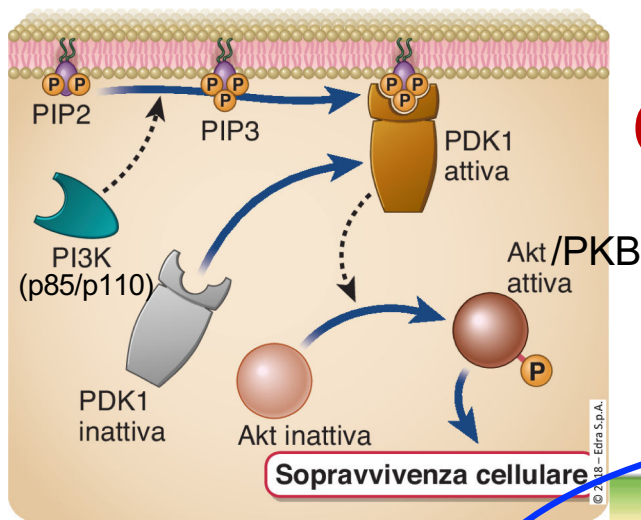


- Dopo interazione con B7, CD28 si lega a **Vav1** (probabilmente attraverso Grb2 e pYMMN) e si associa a **PIP5K**.
- **PIP5K** genera PIP2 che favorisce il **reclutamento di WASP**.
- Vav1 attiva Cdc42 che lega WASP che una volta attivato lega Arp2/3 inducendo così polimerizzazione e la riorganizzazione del citoscheletro di actina.
- La sequenza c-terminale di CD28 PYAP ricca di proline, si lega alla **filamina A** (FLNa) una "actin-binding protein" che stabilizza l'actina.

Struttura di CD28



CD28 e attivazione PI3K/Akt pathway



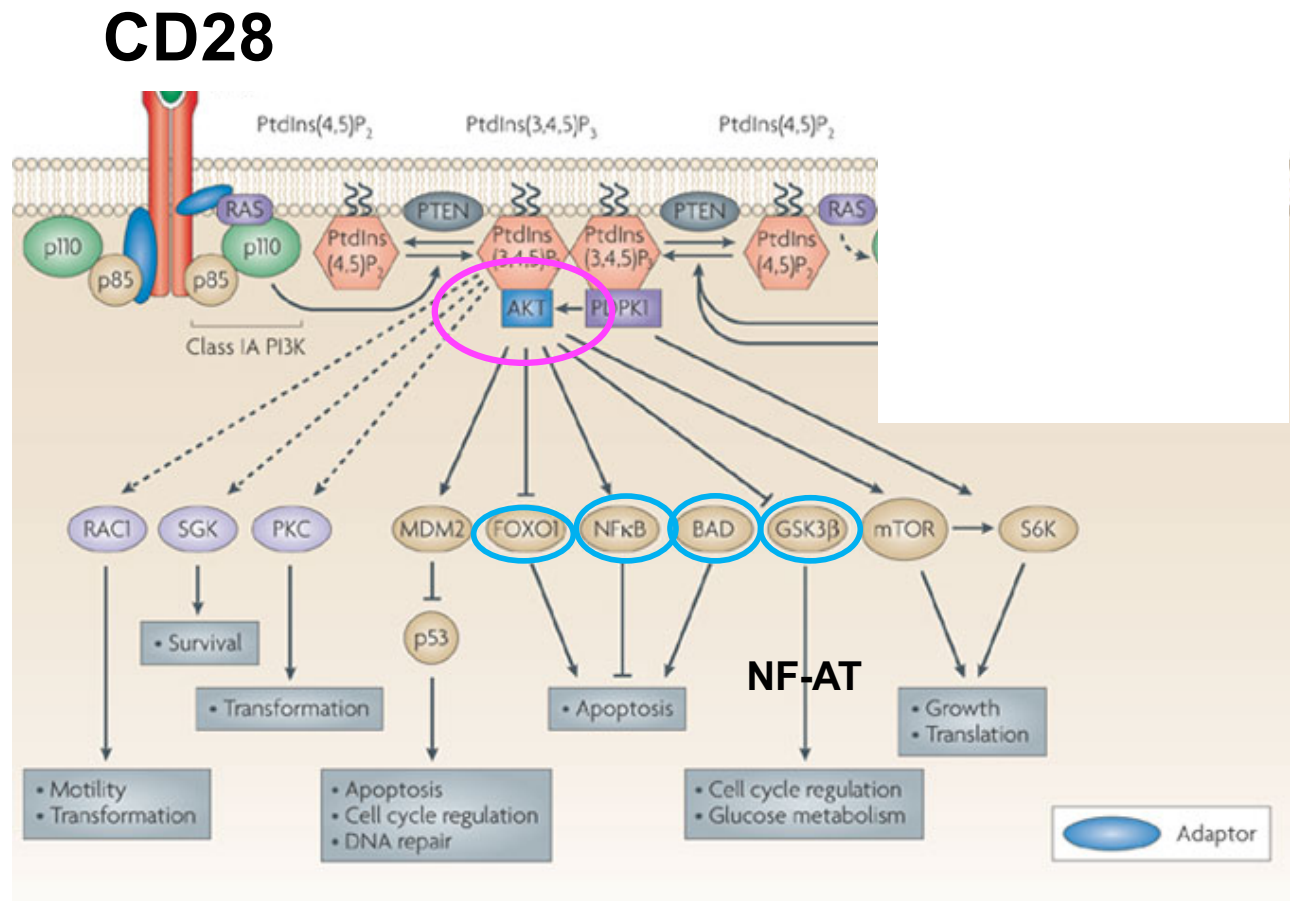
Dopo interazione del CD28 (nell'uomo) con il B7, l'**YMNM** fosforilato in tirosina si lega al dominio **SH2 della subunità regolatoria p85 PI3K di classe 1A** attivandola → fosforilazione di PIP2 con produzione di PIP3. PIP3 lega PDK1 e Akt(PKB) → attivazione della via di segnalazione di Akt e mTOR.

Effetti di CD28 dipendenti da PI3K/Akt

1. Inattivazione di GSK3 mediata da Akt. GSK3 (*glicogeno sintasi chinasi 3*) fosforila NF-AT favorendone il suo sequestro nel citosol e impedendo la traslocazione nel nucleo. Akt fosforila GSK3 sui residui Ser (residuo 9 per GSK3 β e residuo 21 per GSK3 α), e la inattiva permettendo che NF-AT sia presente nel nucleo e migliorando la trascrizione dei geni bersaglio.

2. Akt regola il metabolismo cellulare. La transizione da una cellula T a riposo a una cellula T effettrice richiede un **aumento della glicolisi** per fornire energia e per l'attivazione. Akt fosforila diversi enzimi della via glicolitica e ne potenzia l'attività. Inoltre mTORC1 migliora la glicolisi.

3. Protezione dall'apoptosi mediata da PI3K/Akt. Akt fosforila e inattiva i fattori di trascrizione pro-apoptotici della famiglia **FOXO** (FOXO 1 induce la trascrizione di diversi fattori pro-apoptotici della famiglia Bcl-2). Akt reduce l'attivazione della caspasi-8, della proteina pro-apoptotica BID (BH3-interacting domain death agonist) e della caspasi-3.



4. Akt favorisce l'attivazione di NF- κ B

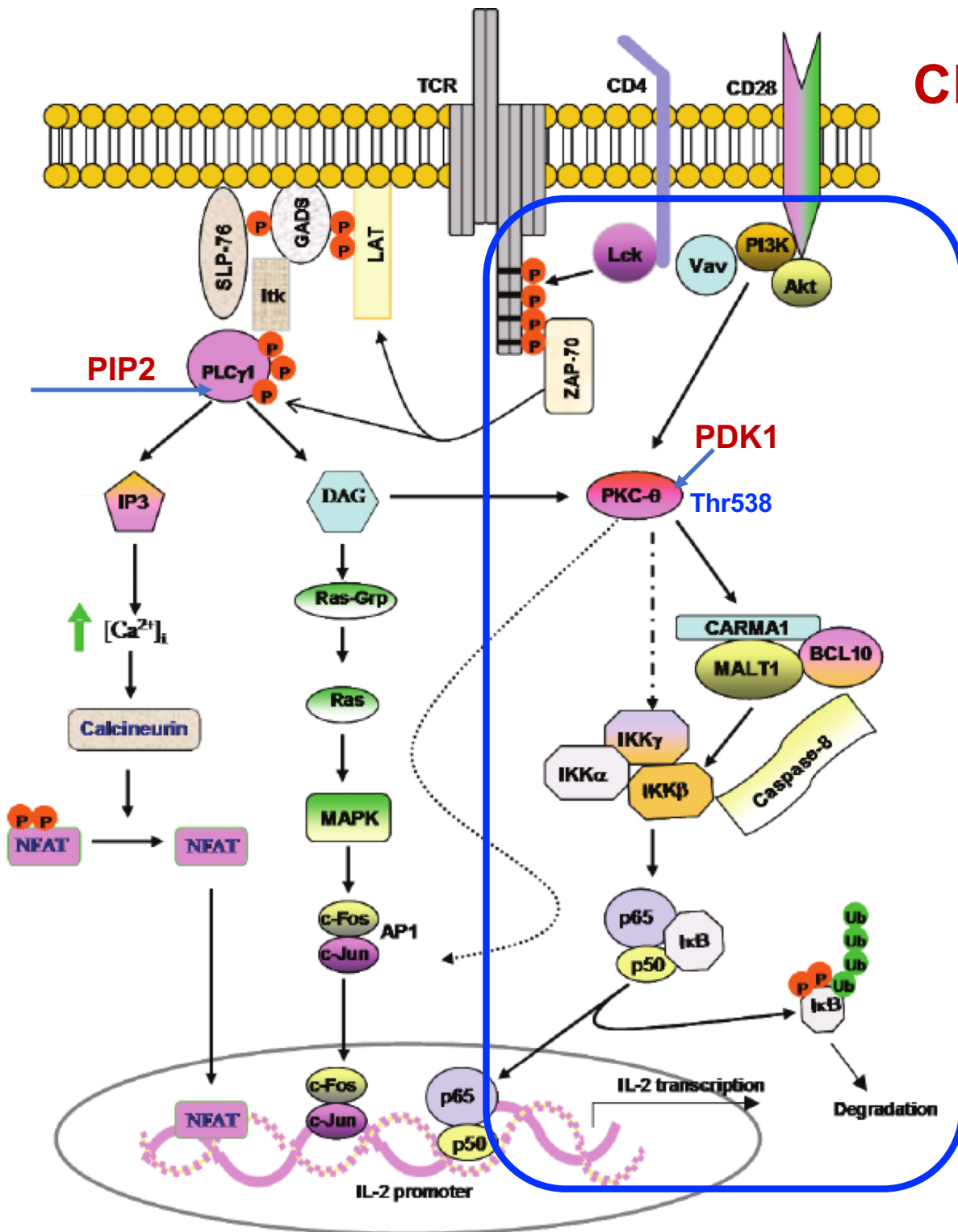
CD28 e attivazione della via canonica di NF- κ B

Attivazione selettiva di NF- κ B

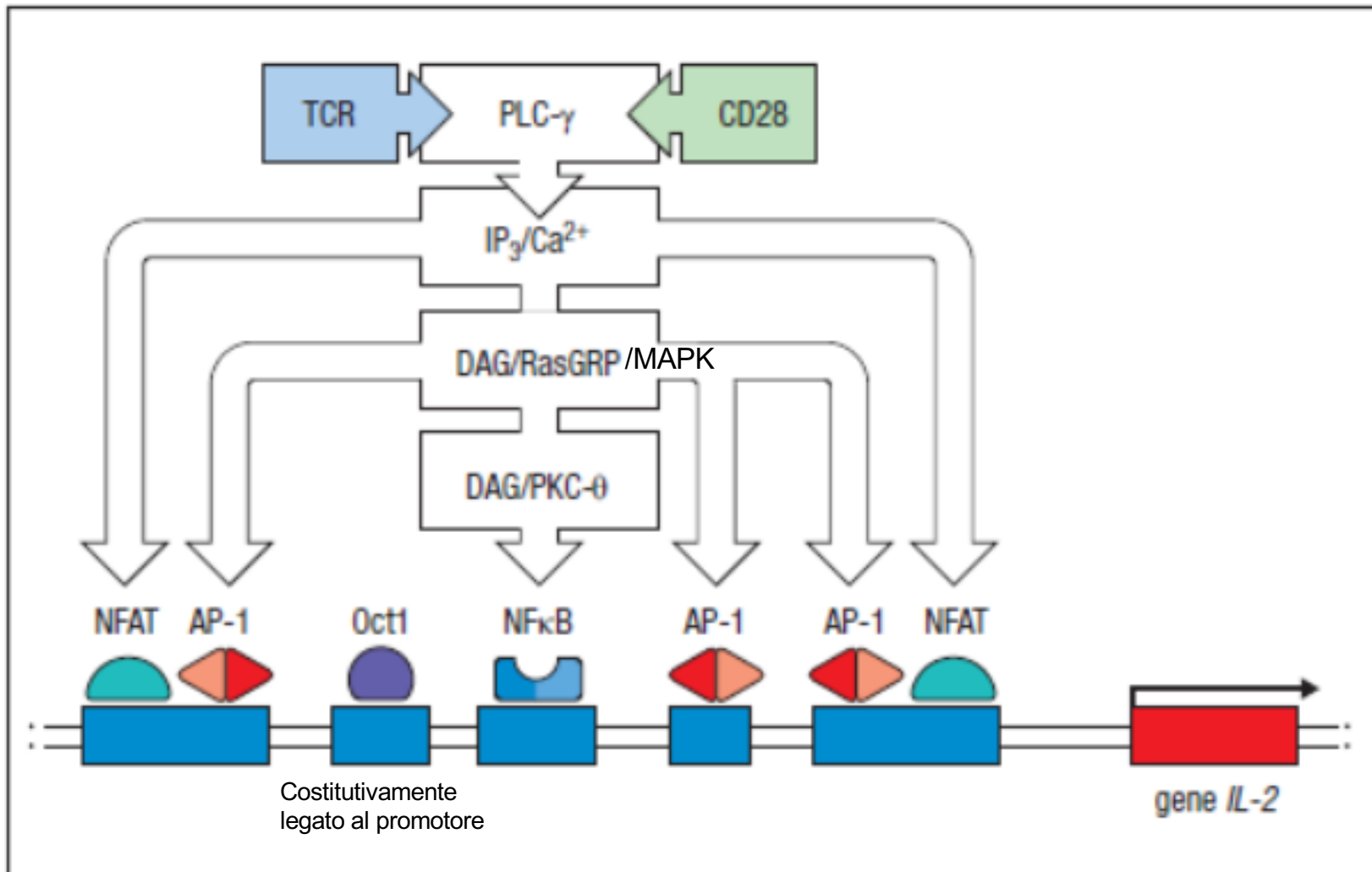
(blocco dell'anergia e espressione di citochine)

Il legame iniziale della **subunità p85 PI3K** al motivo **YMMN fosforilato** in tirosina di CD28 porta all'attivazione di **PI3K**.

PI3K promuove il reclutamento e attivazione di **PDK1** che fosforila e attiva **PKC θ** (Thr 538) che recluta e attiva CARMA1 favorendo così la formazione del complesso: **CARMA1/Bcl10/MALT1** e l'attivazione del complesso **IKK** che attiva poi **NF- κ B**.

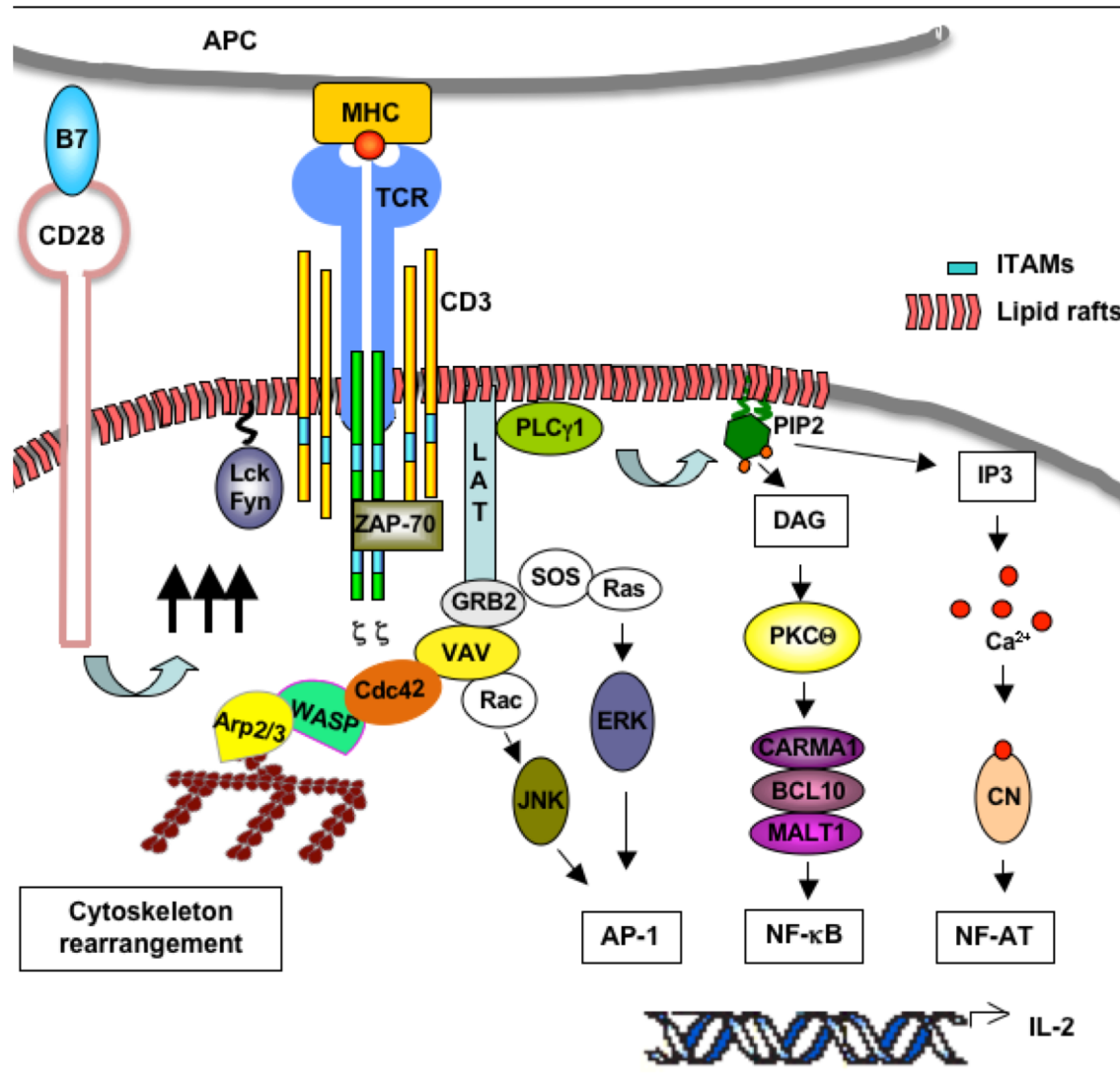


Schema semplificato delle vie di trasduzione TCR e CD28 convergenti sul promotore di IL2



Potenziamento di NF-AT, NF κ B, AP1 e MAPK
(espressione di IL-2 e CD25, IFN- γ , IL-4, altro)

CD28 amplifica i pathways di signaling indotti dalla stimolazione attraverso il TCR



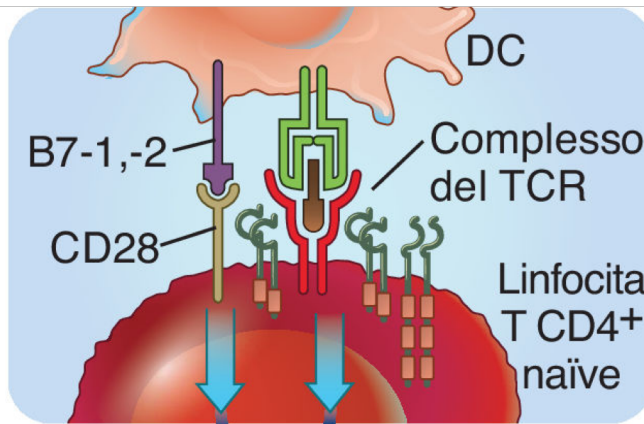
In seguito al riconoscimento, da parte del TCR, dei complessi peptide-MHC presentati sulla superficie delle APC, Lck e Fyn fosforilano le catene CD3 e zeta, che legano ZAP-70.

ZAP-70 fosforila LAT che a sua volta lega PLCγ1 che induce l'attivazione Ca²⁺/Calcineurina (CN)-dipendente di NF-AT nonché di PKC-θ che recluta e attiva CARMA1/Bcl10/MALT1 e poi NF-κB.

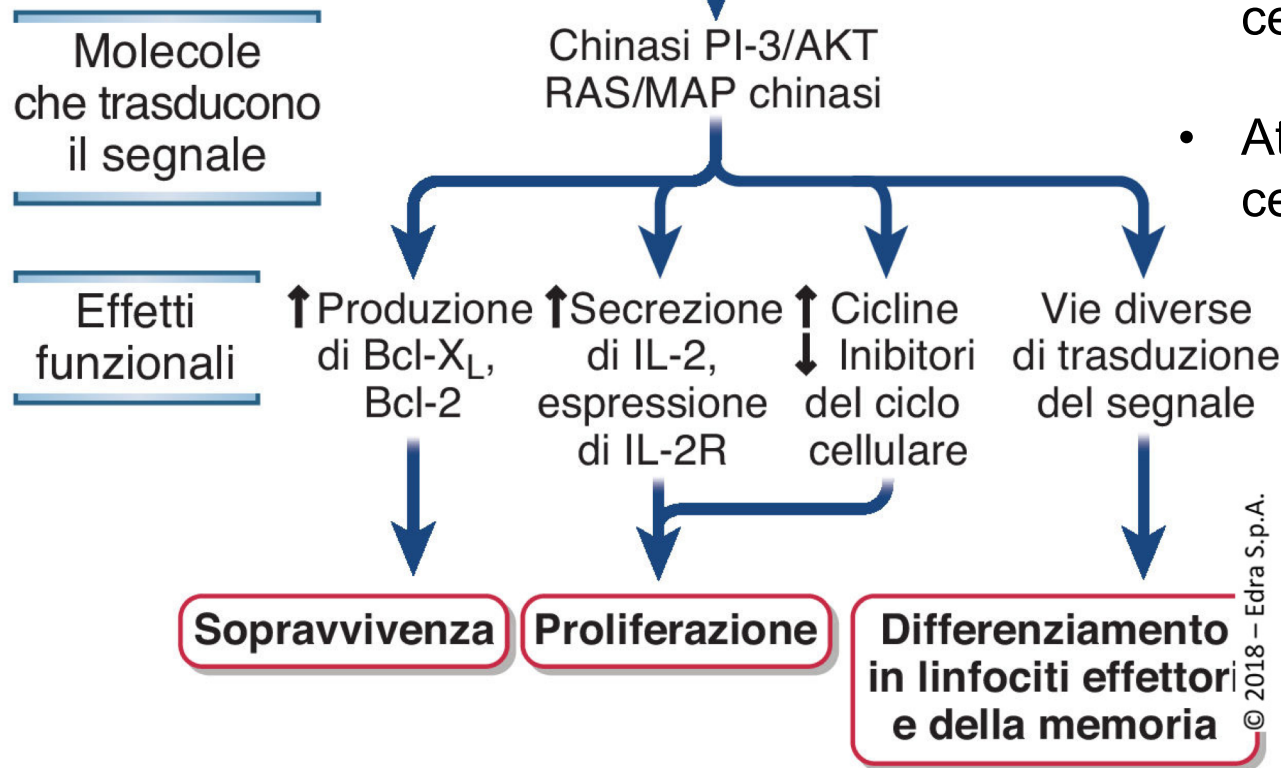
Il legame di Grb2 a LAT recluta SOS e Vav1 che attivano rispettivamente Ras/ERK e Rac-1/JNK inducendo AP-1. Grb2/ Vav1 attivano anche Cdc42/WASP/Arp2/3 favorendo così il riarrangiamento del citoscheletro di actina necessari per la mobilizzazione dei raft lipidici di membrana.

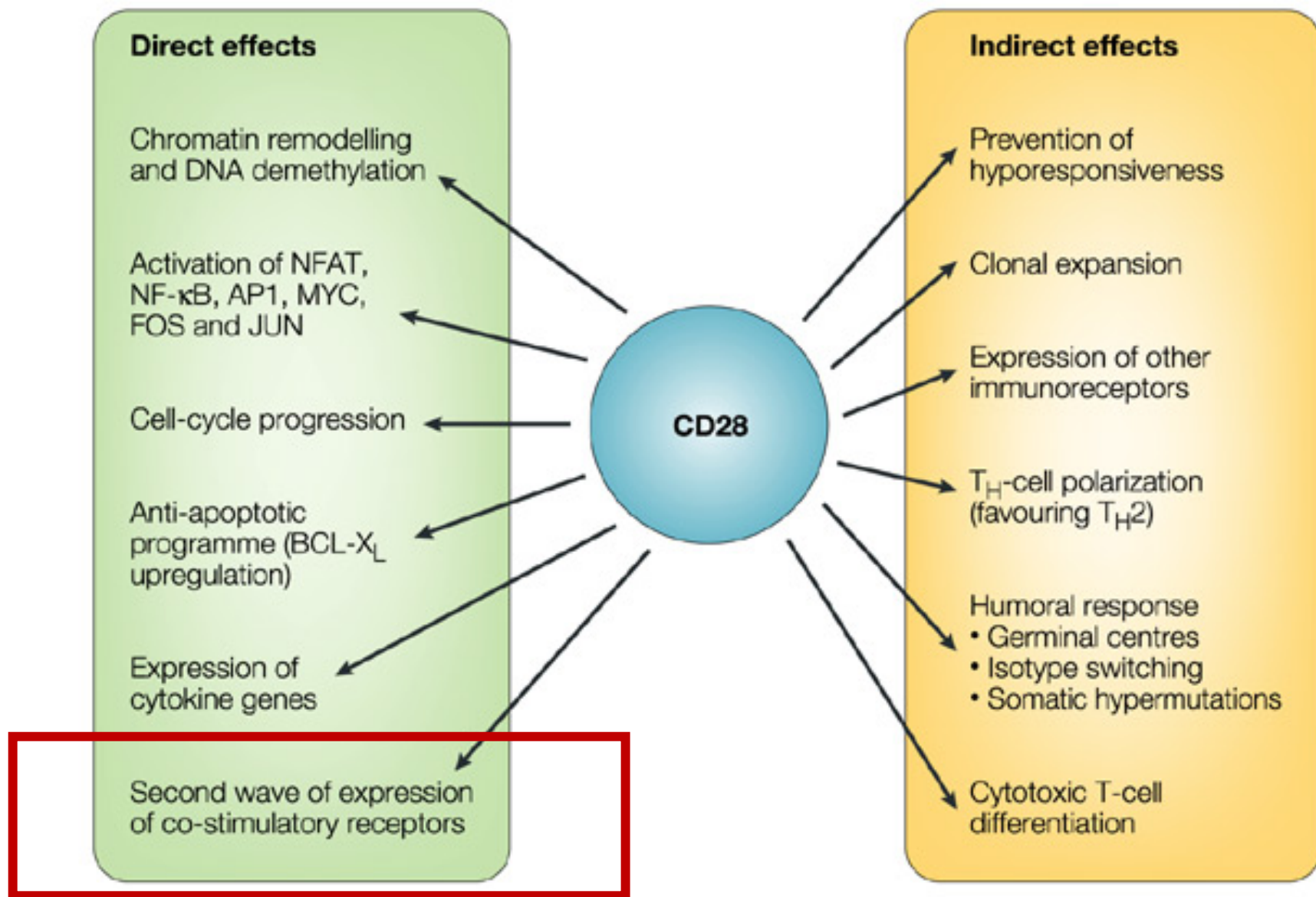
NF-AT, NF-κB e AP-1 cooperano per transattivare il gene IL-2.

La stimolazione del CD28 potenzia i segnali di attivazione indotti dal signaling del TCR



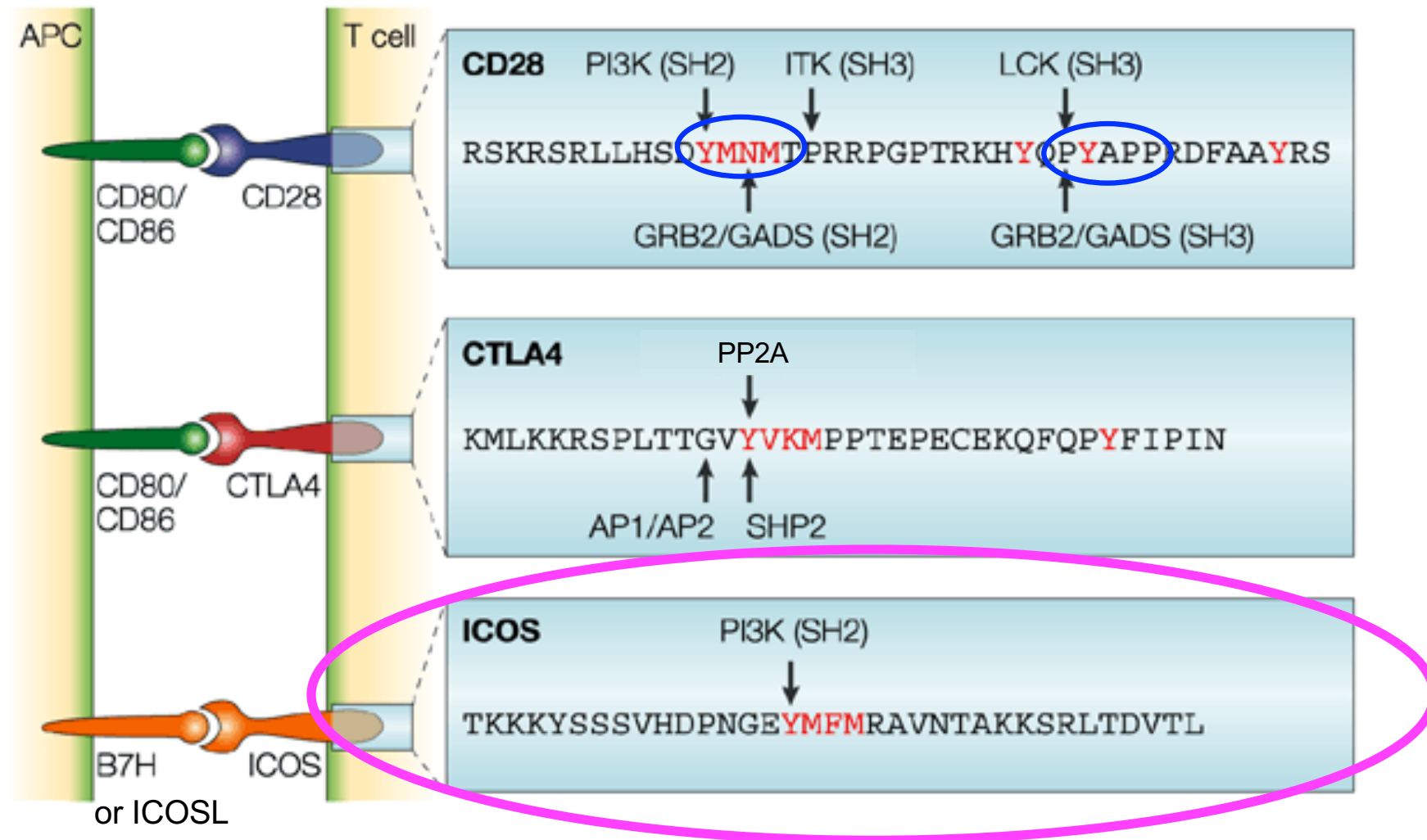
- Aumento dell'espressione delle proteine anti-apoptotiche
- Aumento della produzione di citochine e dell'espressione dei recettori per citochine
- Stimolazione della proliferazione cellulare
- Attivazione del differenziamento cellulare





ICOS, CTLA4 e PD-1

Recettore costimolatorio ICOS (Inducible T-cell COStimulator)

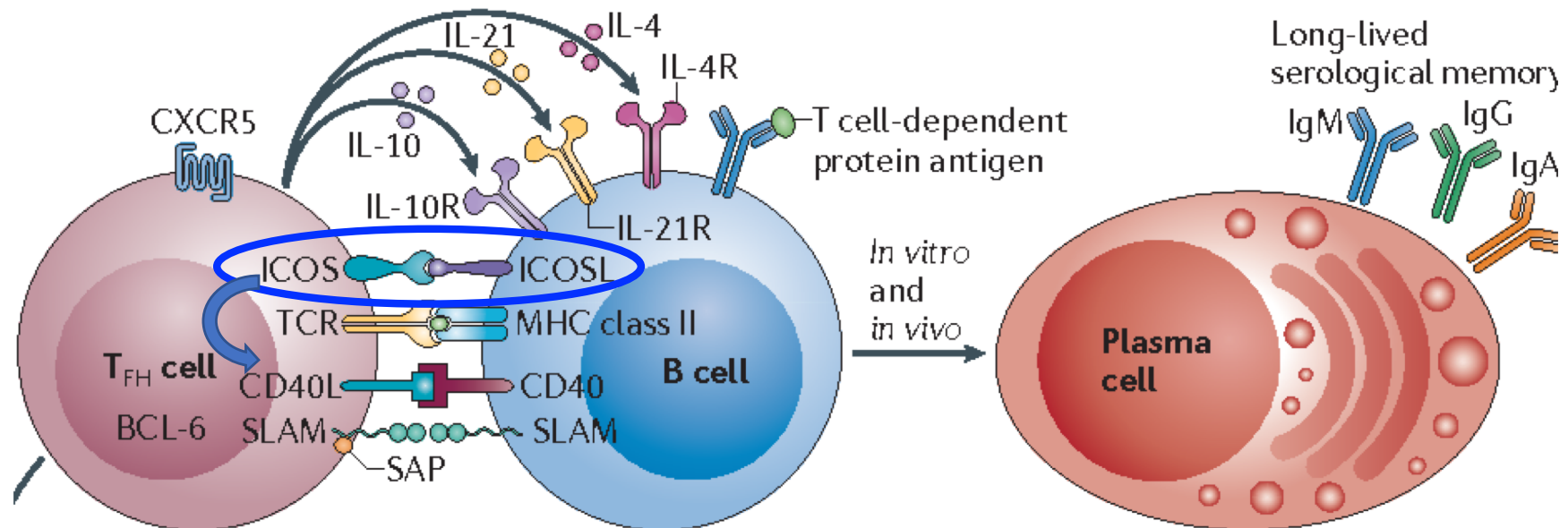


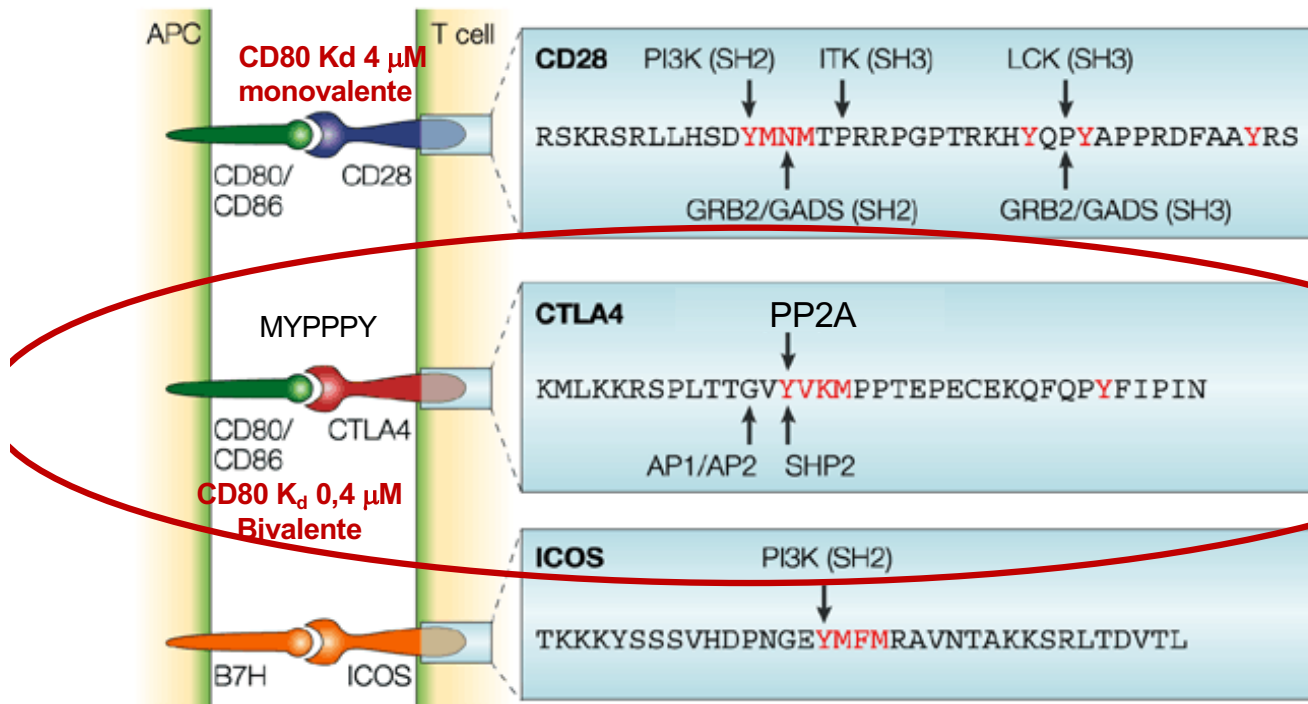
CD28 possiede il motivo **YMN**M

ICOS possiede il motivo **YMF**M che non lega Grb2 e non ha il motivo PYAPP

Effetti della co-stimolazione da parte di ICOS

- Espresso solo su linfociti T attivati
- Come il CD28 attiva la PI3K/AKT (grazie al motivo **YMFM**) ma non attiva MAPK, NF- κ B e non induce IL-2
- Implicato nella regolazione delle funzioni dei linfociti T helper follicolari (T_{fh}), una popolazione di linfociti Th che nel centro germinativo del follicolo aiuta i linfociti B a differenziarsi in plasmacellule a lunga sopravvivenza che producono anticorpi ad alta affinità
- Potenzia l'espressione di CD40L sui linfociti, favorendo il differenziamento dei linfociti B in plasmacellule attraverso il legame CD40-CD40L





CTLA4:

Recettore co-inibitorio

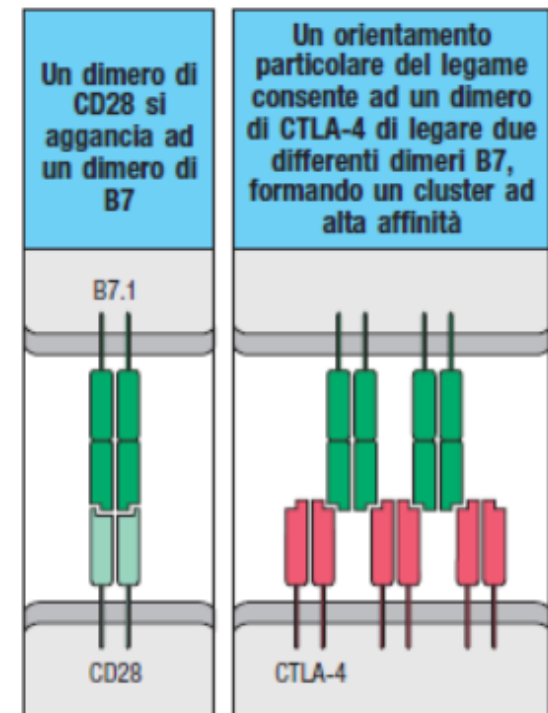
PP2A: Ser/Thr fosfatasi

SHP2: Tirosin fosfatasi

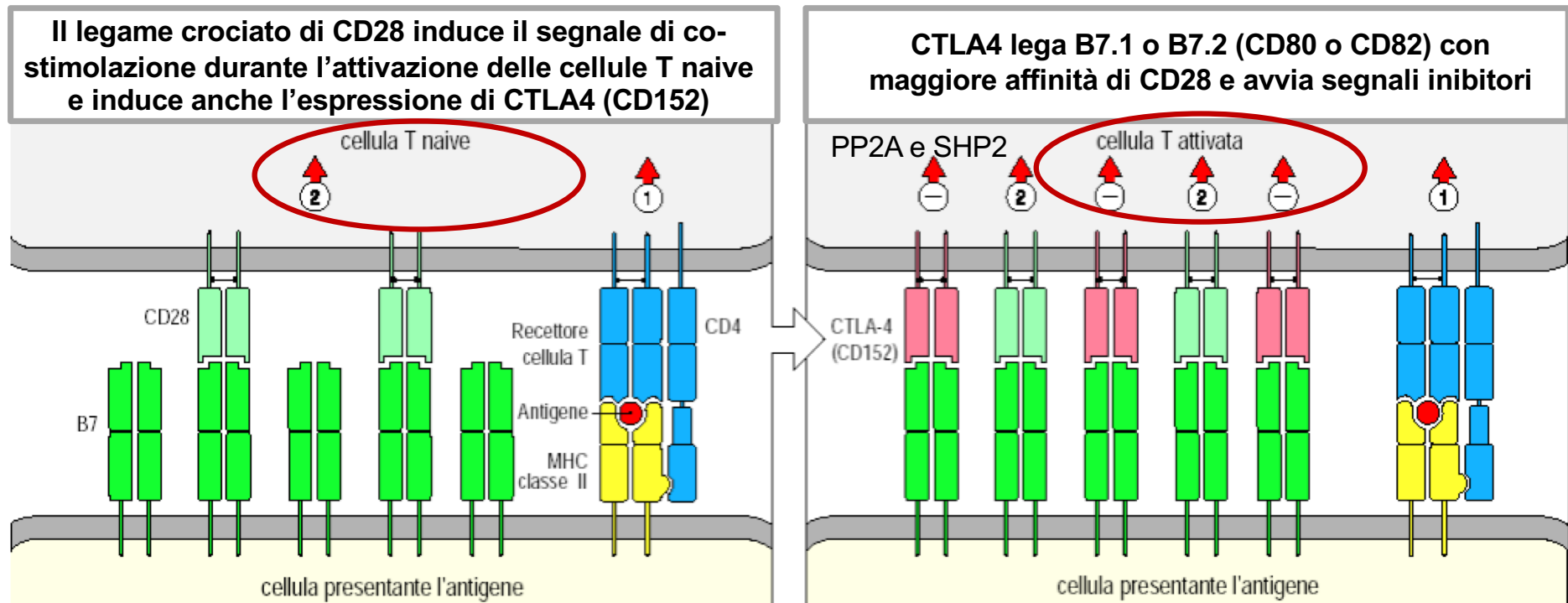
CTLA4 = Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

Nature Reviews | Immunology

CTLA-4 ha un'affinità maggiore per B7 rispetto al CD28 e lo impegna in un orientamento multivalente

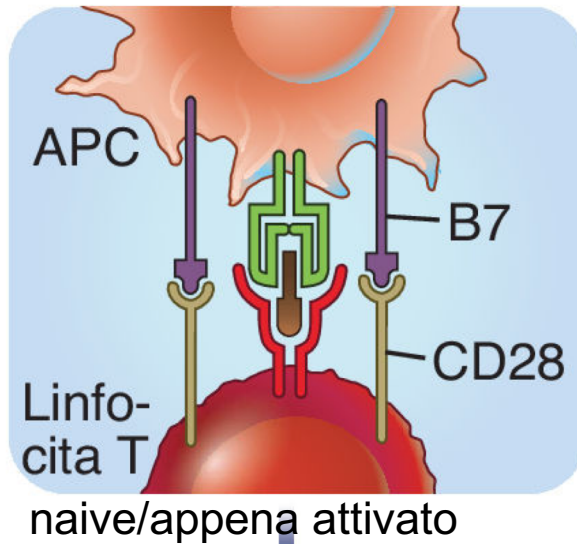


CTLA4 (coinibitore) è espresso dai linfociti T attivati da TCR/CD28 ed ha un effetto opposto a quello di CD28

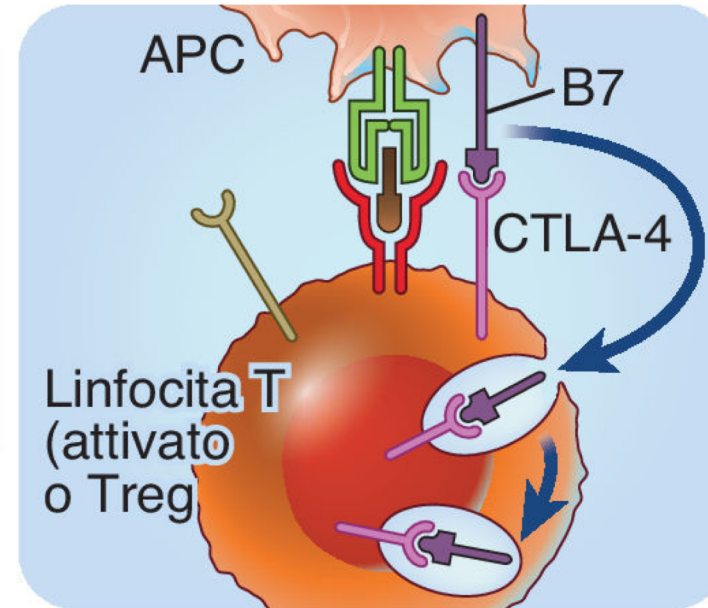


L'espressione a livello proteico di CTLA-4 è rilevabile sulla superficie dei linfociti T 24-48 ore dopo attivazione.

Effetti funzionali del recettore inibitorio CTLA4

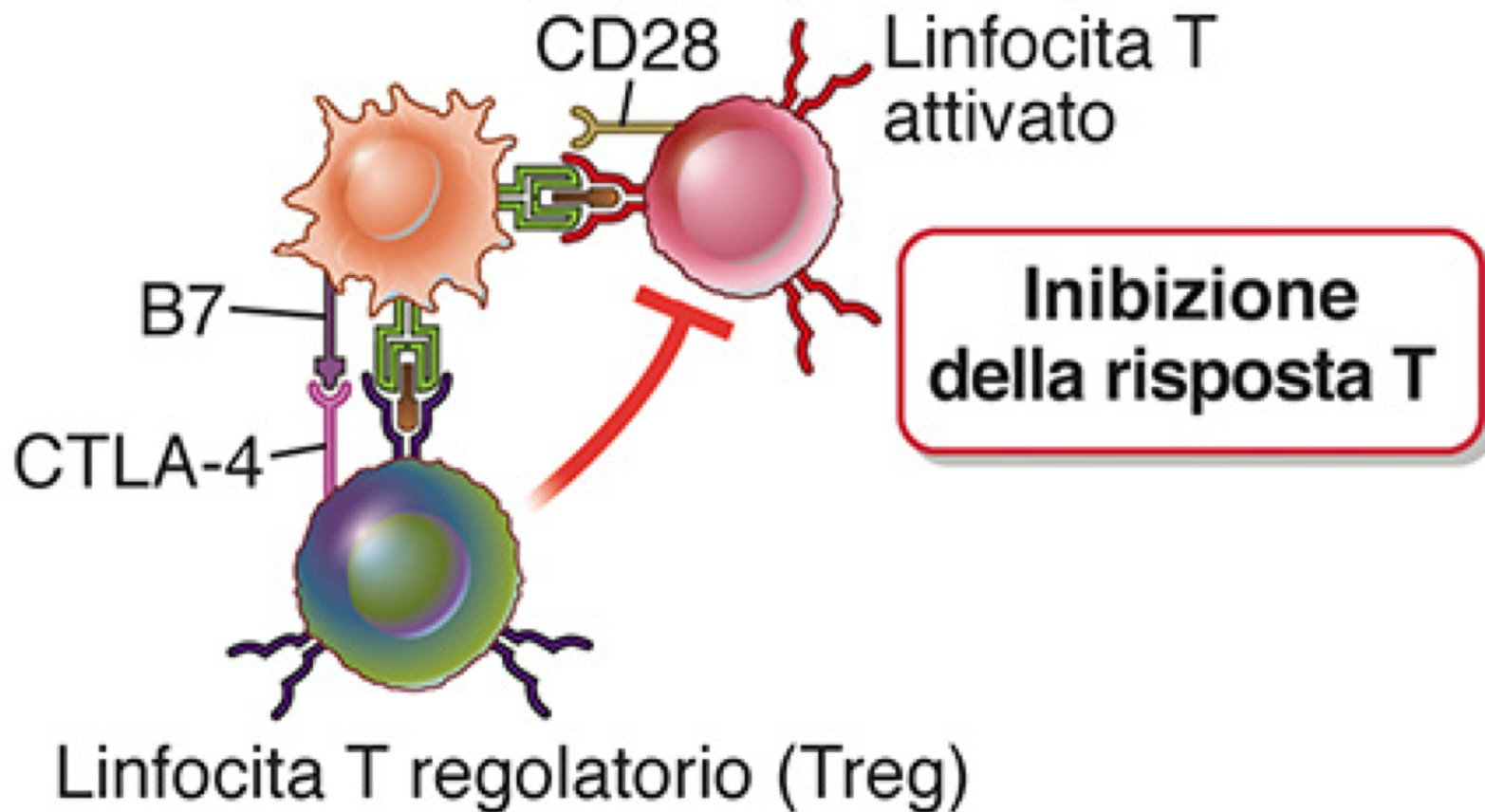


**Costimolazione ⇒
attivazione
linfocita T**



**CTLA-4 blocca
e rimuove B7 ⇒
mancanza
costimolazione ⇒
assenza risposta
del linfocita T**

CTLA4 è espresso costitutivamente dai linfociti Treg



Effetti dell'espressione di CTLA4

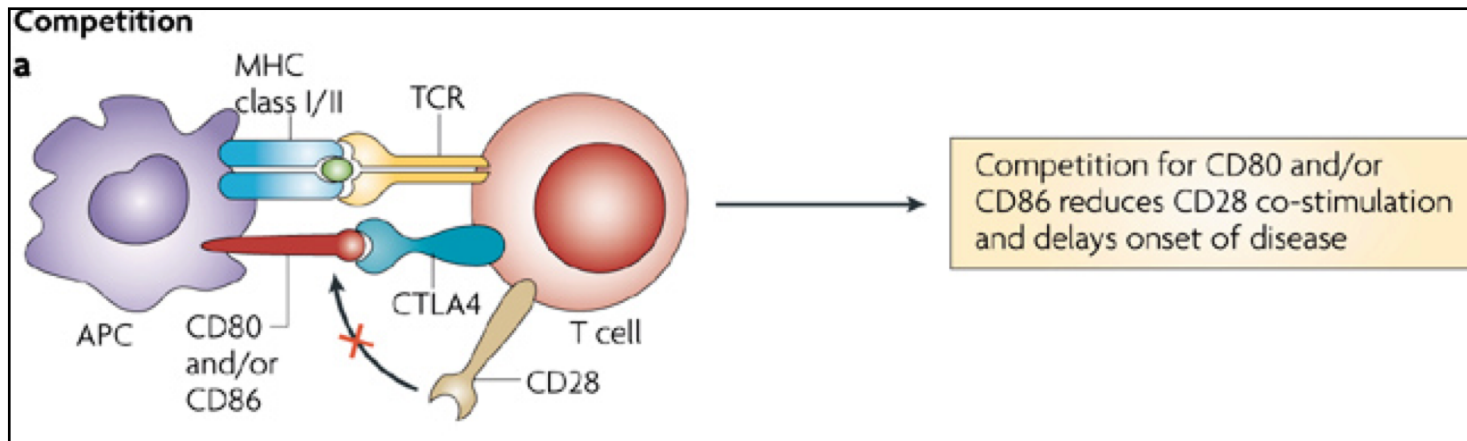
- Espresso dai linfociti T attivati da TCR/CD28 (dai T-memory) e costitutivamente dai Treg, una sottopolazione di linfociti T CD4⁺ che sopprime la risposta immune.
- Protezione contro malattie autoimmuni (tolleranza periferica): topi knockout per CTLA4 sviluppano una sindrome linfoproliferativa fatale (infiltrazione e distruzione di organi e tessuti; morte entro le 3 sett).
- **Nel 2014 è stata identificata nell'uomo una patologia a trasmissione mendeliana causata da mutazioni in eterozigosi di CTLA4 (CHAI= CTLA4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration).**

Regola negativamente la risposta immunitaria, spegnendo le vie di segnalazione mediate da TCR e CD28 mediante due possibili meccanismi:

1. Competizione: l'alta avidità del legame tra CTLA4 e B7 crea forte competizione del legame di CD28 con B7.

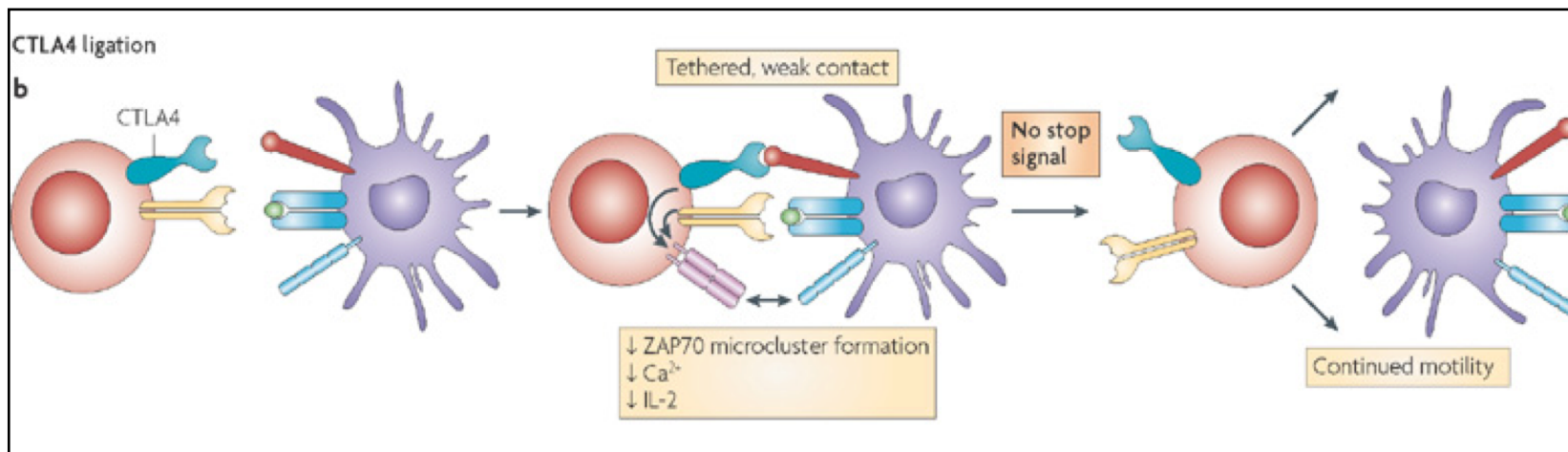
2. Interferenza con il signalling e la formazione dei rafts lipidici: il motivo **YVKM** recluta le fosfatasi **PP2A** e **SHP2**, che defosforilano le molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (Zap70, LAT, Vav)

1. Inibizione mediata da CTLA-4: competizione con CD28



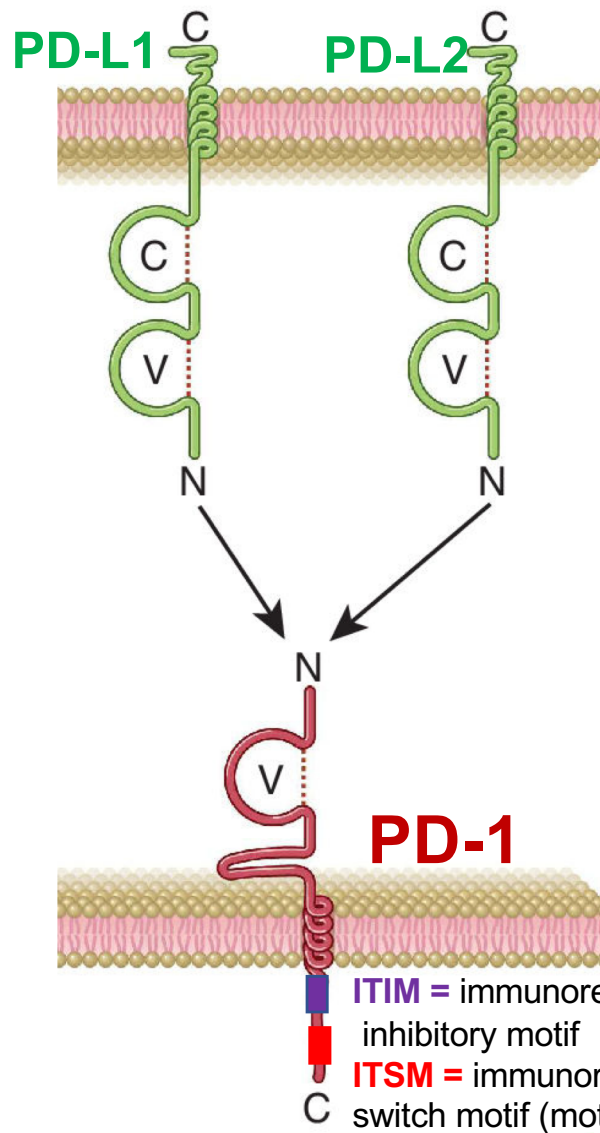
La maggiore affinità di CTLA4 per B7.1/B7.2 sequestra le molecole B7. Assenza di co-stimolazione CD28 → inibizione del TCR signalling

2. Inibizione mediata da CTLA-4: interferenza con il TCR/CD28 signalling



Totale defosforilazione dei substrati e MAPK

YVKM lega due fosfatasi: **SH2** (SH2-domain-containing protein **tirosina fosfatasi 2**) e la **serin-treonin fosfatasi PP2A**. Entrambe defosforilano componenti necessari per la segnalazione. La differenza principale è che SH2 ha come bersaglio i residui di fosfotirosina, mentre PP2A defosforila i residui di serina e treonina.



PD-1: recettore inibitorio

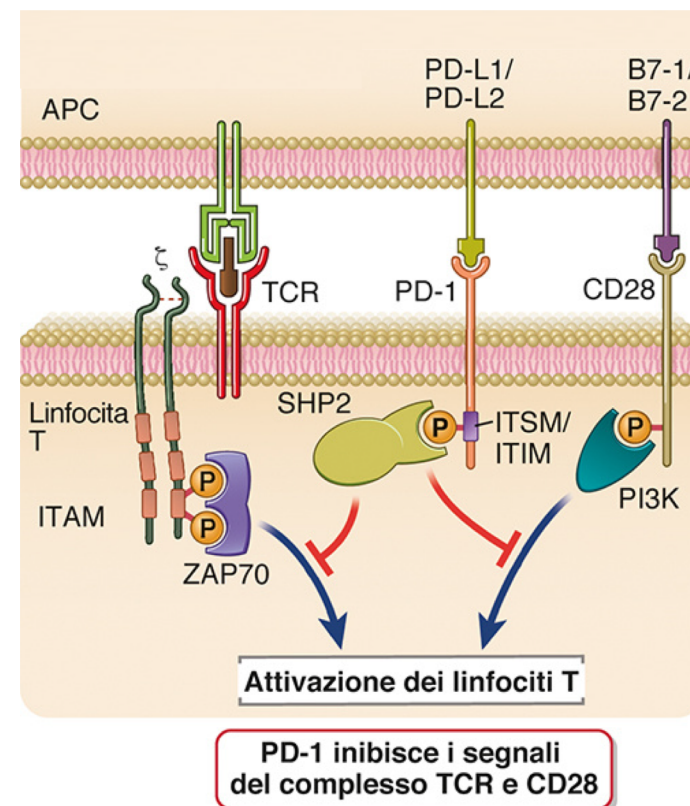
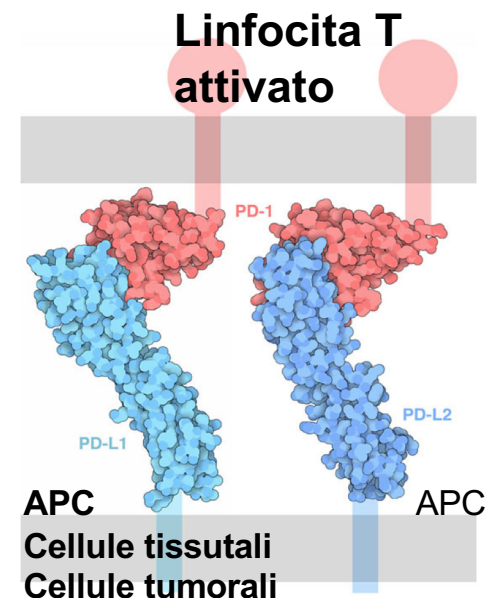
- **PD-1**, recettore inibitorio espresso sui linfociti effettori attivati in presenza di infezioni croniche persistenti o tumori, che riconosce i ligandi **PD-L1** e **PD-L2**

-**PD-L1** espresso su APC e cellule tissutali

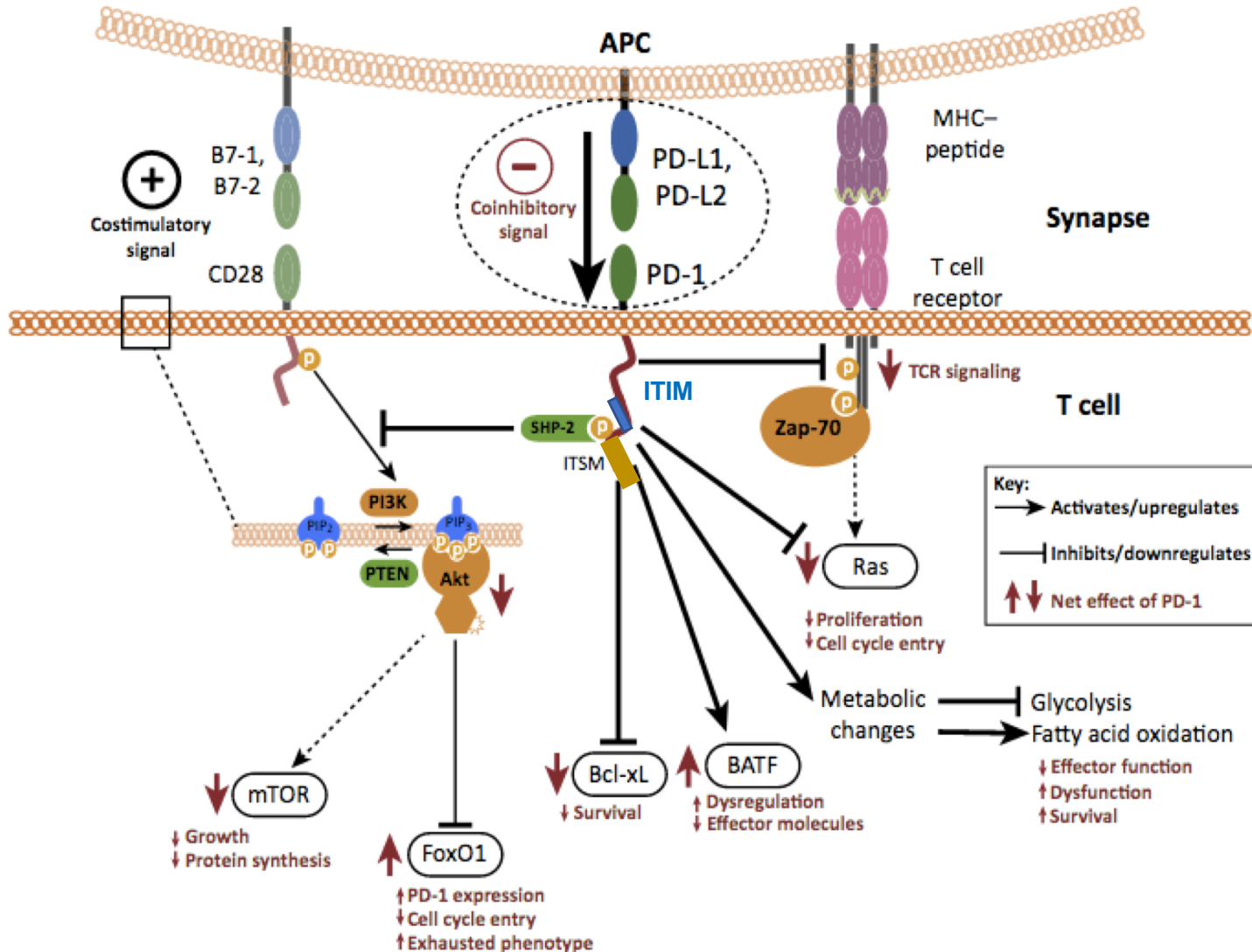
-**PD-L2** è espresso solo sulle APC

-Stimolazione di PD-1 porta all'inattivazione dei linfociti T

-Espressione di **PD-L1** è un meccanismo attraverso il quale i tumori evadono la risposta immune adattativa



PD-1 inhibitory signaling



ITIM e ITSM :

- Reclutamento della **tirosin fosfasi (SHP2)**
- Inibizione del signaling del TCR e del pathway di PI3K

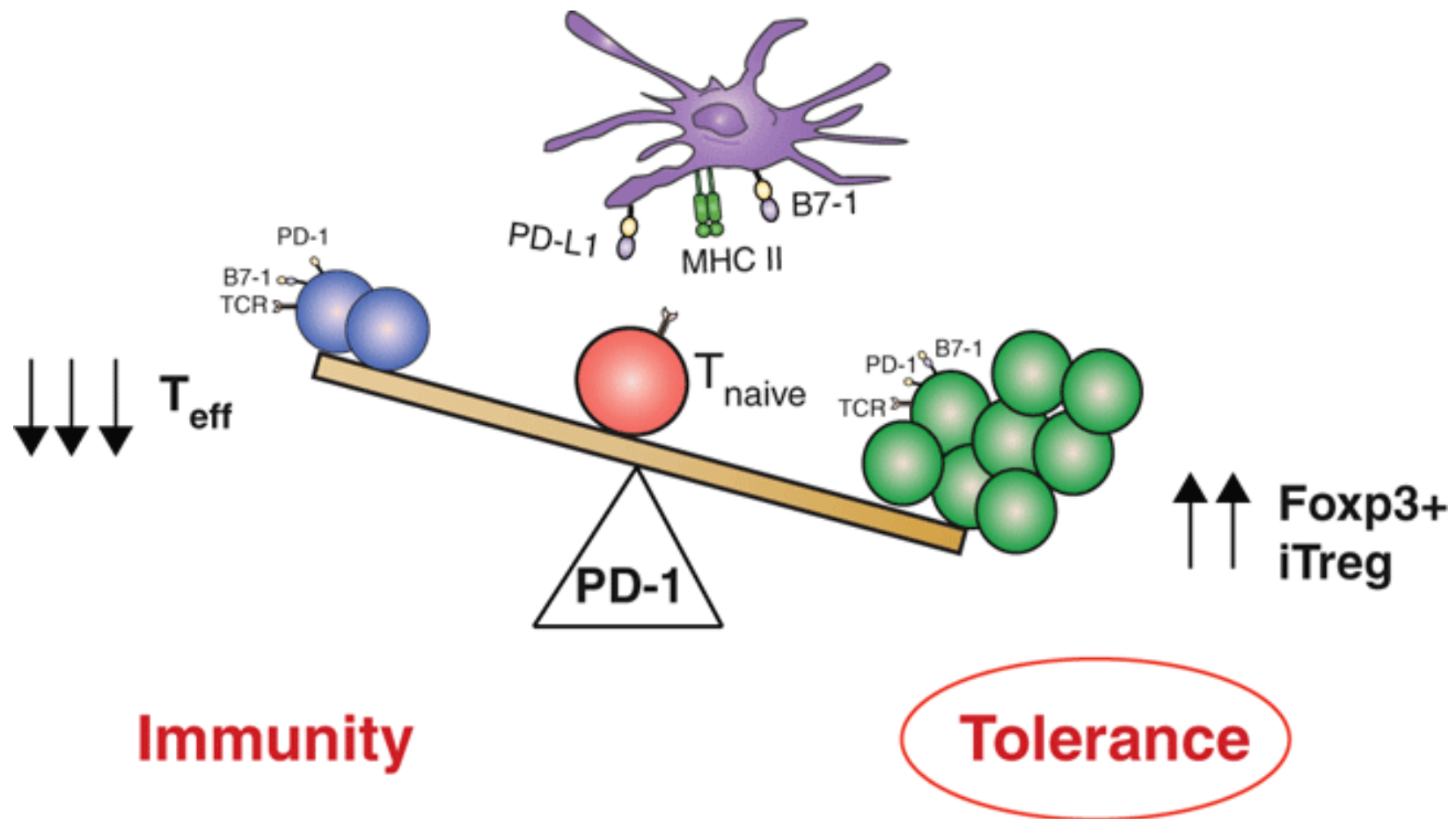
Effetti:

Diminuisce la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, la sintesi proteica, le funzioni effettrici, cambia il metabolismo e la cellula T acquisisce un fenotipo "exhausted".

TRENDS in Pharmacological Sciences

ITSM = immunoreceptor tyrosine-based switch motif (motivo interruttore)

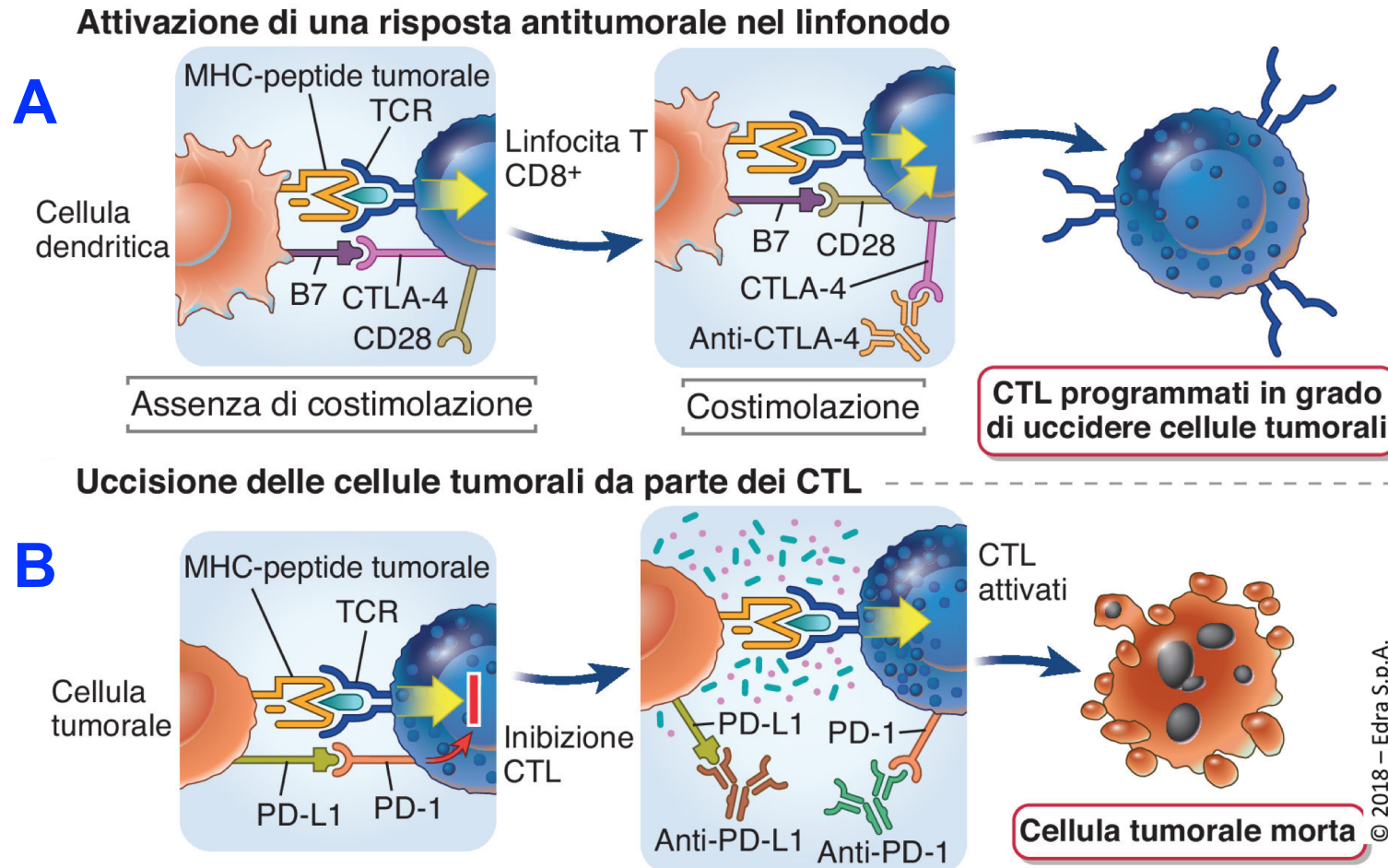
Ruolo di PD1 nella tolleranza



PD1 e **CTLA4** sono entrambi "punti di controllo" (immune checkpoints) delle risposte immunitarie ma presentano anche differenze importanti (ruolo complementare):

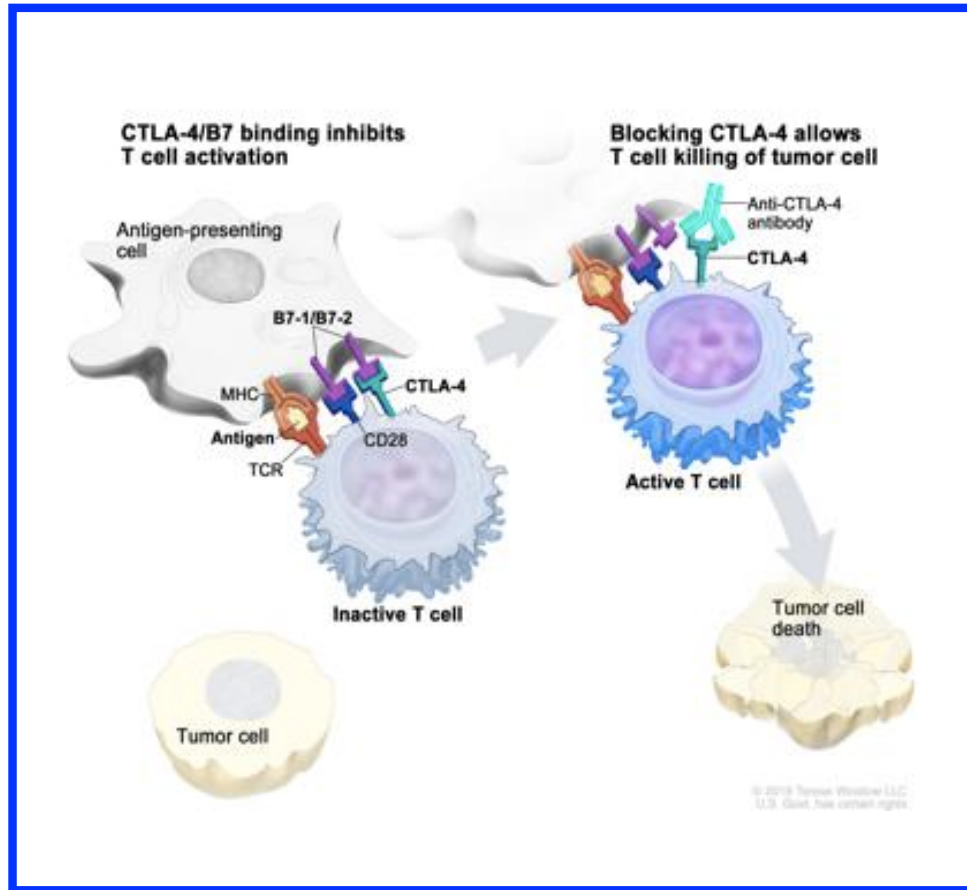
1. Modelli murini mostrano che le deficienze di PD1 inducono patologie autoimmuni molto meno severe di quelle causate da inattivazione di CTLA4.
2. CTLA4 regola l'attivazione iniziale dei linfociti T negli organi linfoidi secondari mentre PD1 è deputato principalmente a spegnere le risposte dei linfociti T effettori (soprattutto linfociti T CD8+) nei tessuti periferici.

Blocco dei checkpoints immunologici nell'immunoterapia dei tumori



I pazienti neoplastici presentano spesso una risposta cellulare T inefficace verso i tumori a causa dell'aumentata espressione di CTLA4 e PD1, sulla superficie delle cellule T e l'espressione del PDL1 sulle cellule tumorali. **Anticorpi anti-CTLA4 (A), anti-PD1 o anti-PDL1 (B) bloccanti** sono altamente specifici per trattare diversi tipi di tumori in stadio avanzato, rimuovendo l'inibizione dei linfociti T tumore-specifici. Gli anticorpi anti-CTLA4 funzionano bloccando CTLA4 sui linfociti T effettori e sui linfociti T regolatori (Treg).

Immune checkpoint inhibitors in cancer immunotherapy

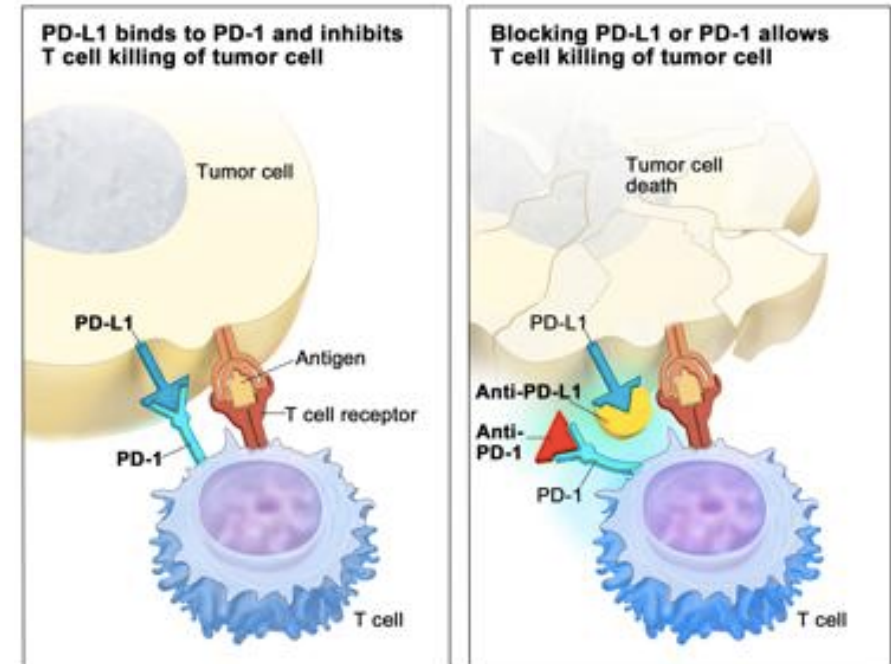


Drugs = anti-CTLA-4 antibodies

Agiscono sia sui linfociti T effettori sia sui linfociti Treg

A type of drug that blocks proteins called checkpoints that are made by some types of immune system cells, such as T cells, and some cancer cells. These checkpoints help keep immune responses from being too strong and sometimes can keep T cells from killing cancer cells. When these checkpoints are blocked, T cells can kill cancer cells better. Examples of checkpoint proteins found on T cells or cancer cells include **PD-1/PD-L1** and **CTLA-4/B7-1/B7-2**.

Some immune checkpoint inhibitors are used to treat cancer.



Drugs = anti-PD1 or anti-PDL1 antibodies