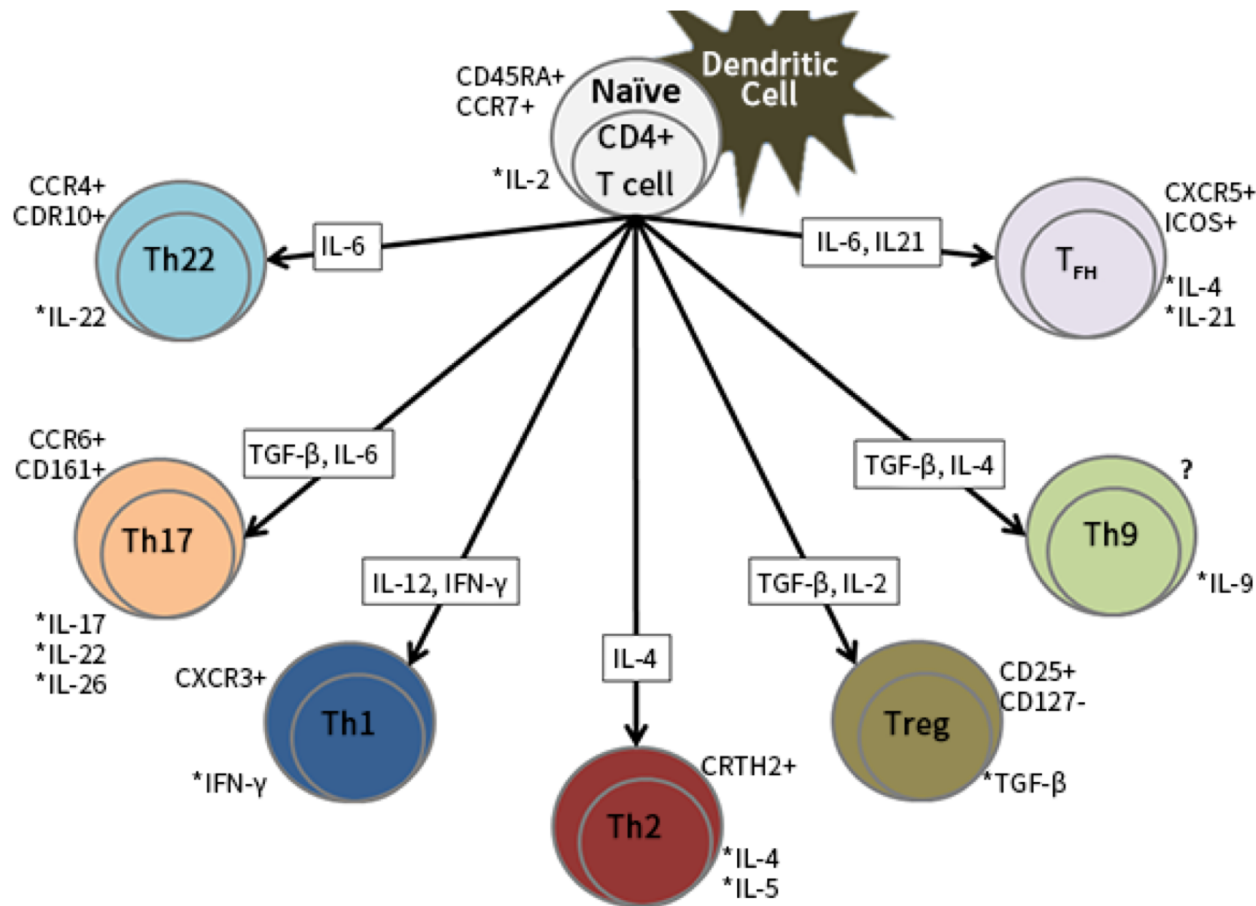


**Codice OPIS 2023-24**

**L88JNELD**

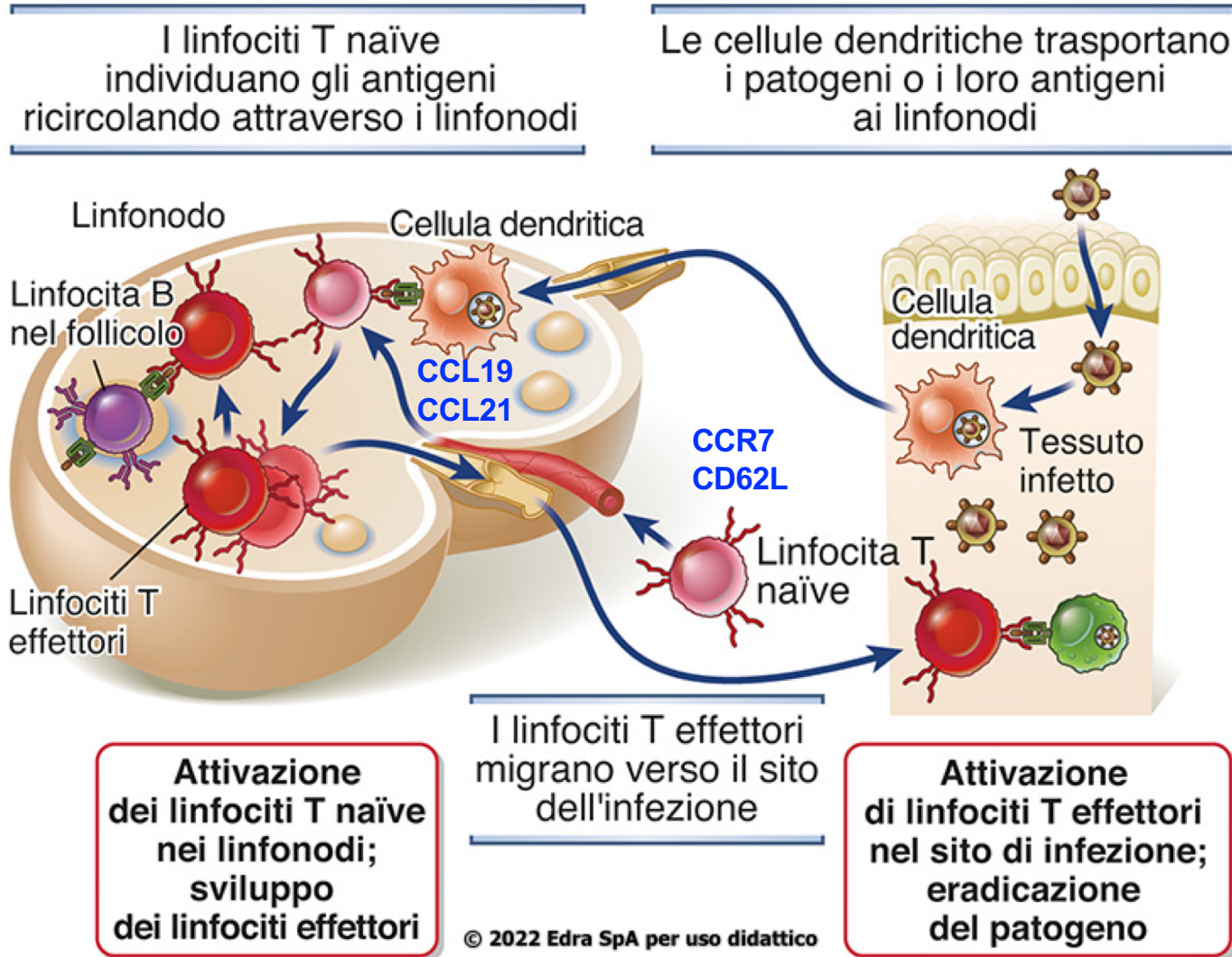
**MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI  
DELLA RISPOSTA IMMUNE (1047783)**

**SCIENZE BIOLOGICHE (30857)**



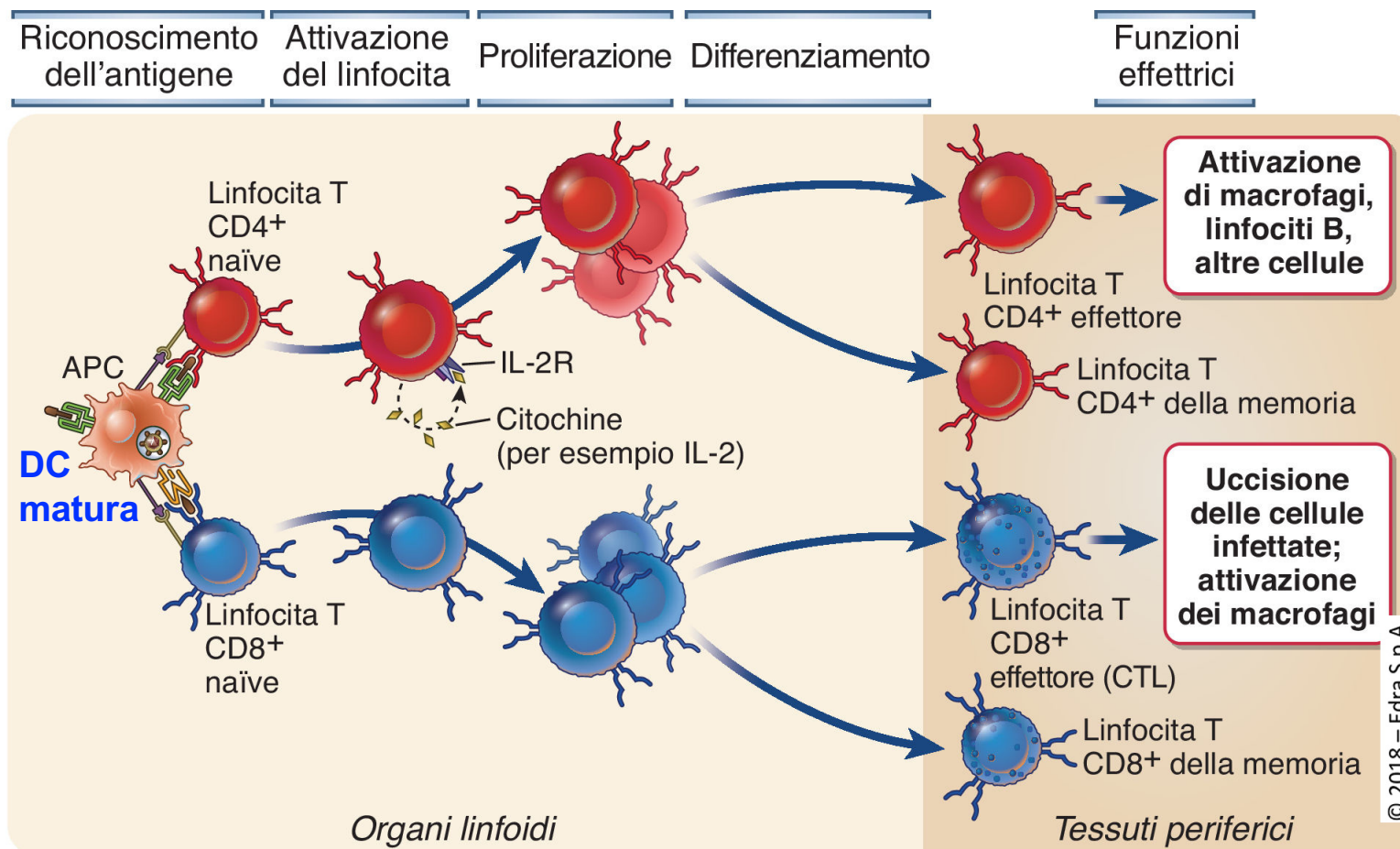
**Differenziamento dei linfociti T  
e specificità delle  
risposte immunitarie cellulo-mediate**

# Attivazione dei linfociti T



Attivazione dei linfociti T naïve ed effettori. Le cellule dendritiche trasportano gli antigeni ai linfonodi dove vengono riconosciuti dai linfociti T naïve. I linfociti T attivati si differenziano in **linfociti effettori** e possono **rimanere negli organi linfoidi** per stimolare, a loro volta, l'attivazione dei linfociti B, oppure **migrare nei siti di infezione**, dove i linfociti effettori vengono stimolati nuovamente dagli antigeni e svolgono le loro funzioni effettrici, tra cui l'attivazione dei macrofagi.

# Attivazione linfociti T

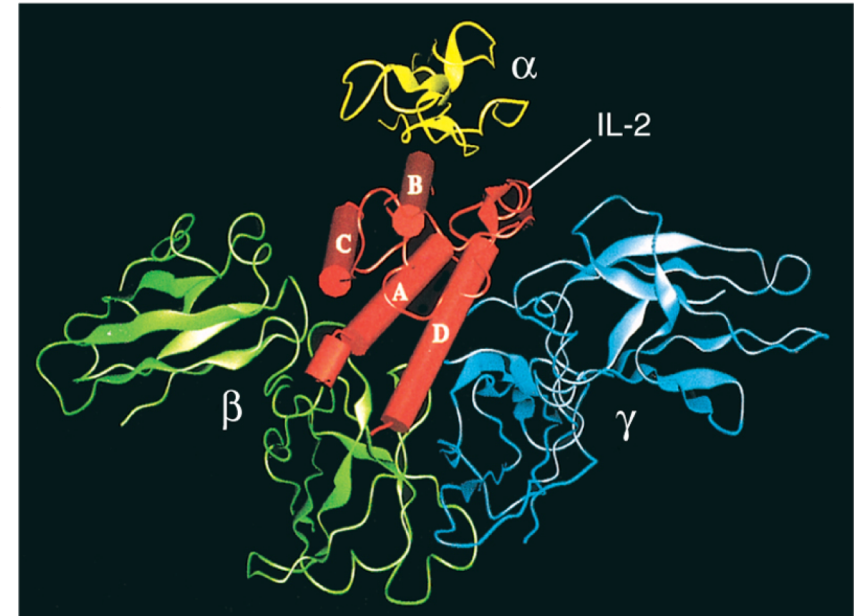
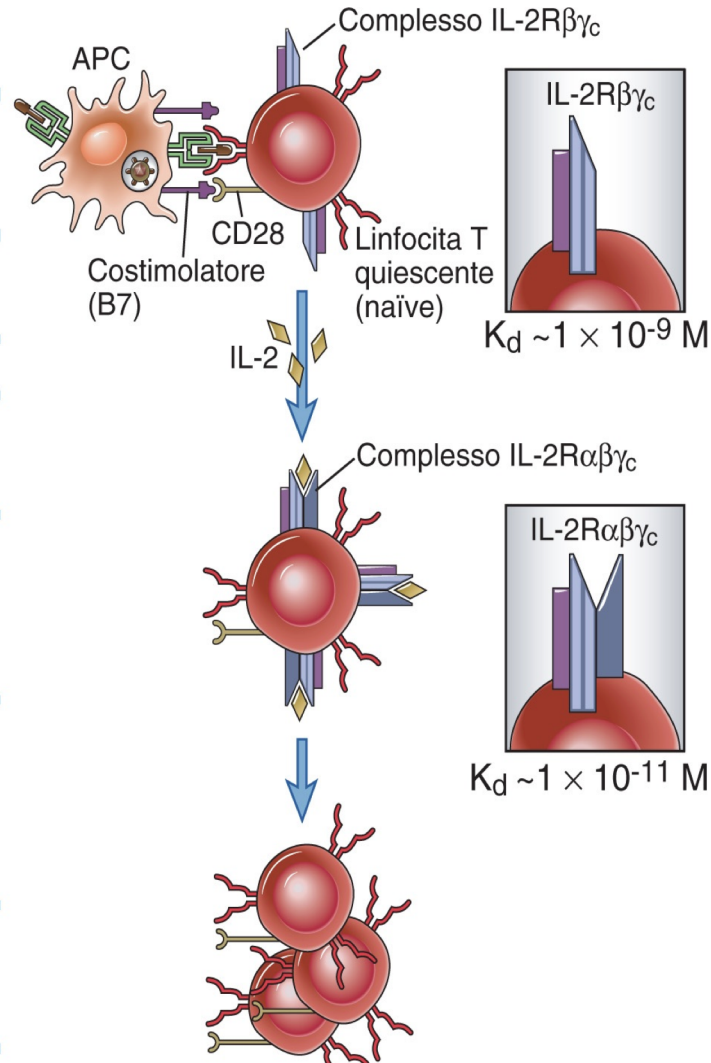


Sequenza dei fenomeni coinvolti nella risposta dei linfociti T. Il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T attiva la secrezione di citochine (per esempio l'IL-2), specialmente da parte dei linfociti T CD4+. Tali citochine, agendo in modo autocrino, inducono l'espansione clonale e il differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici o della memoria. Nella fase effettrice della risposta, i linfociti T CD4+ effettrici rispondono all'antigene producendo citochine dotate di numerose funzioni, quali il reclutamento e l'attivazione dei leucociti e l'attivazione dei linfociti B.

I meccanismi effettrici dei linfociti CD8+ citotossici (CTL) consistono nell'eliminare le cellule infettate e nel produrre citochine infiammatorie.

## Regolazione dell'espressione IL-2 e IL-2R

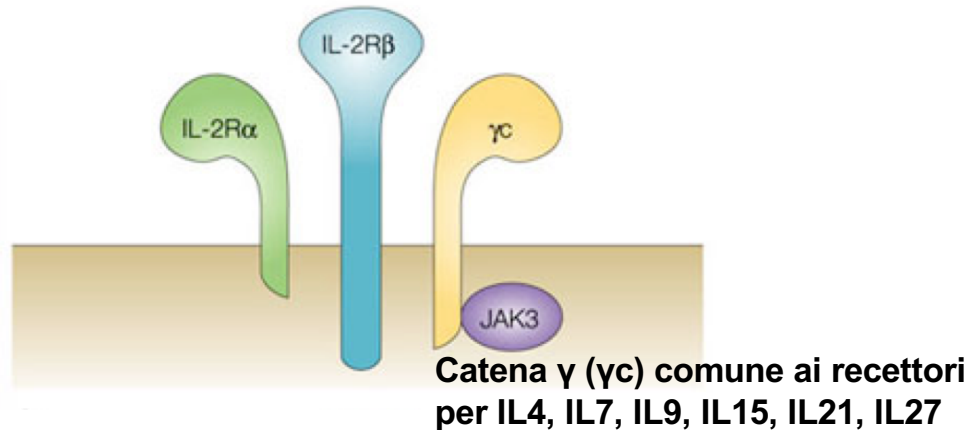
- Attivazione dei linfociti T da parte dell'antigene e di molecole costimolatorie
- Secrezione di IL-2
- Espressione della catena IL-2R $\alpha$ ; formazione del complesso IL-2R $\alpha\beta\gamma$  ad alta affinità
- Catena  $\alpha$  del IL2R o CD25**
- Proliferazione dei linfociti T indotta da IL-2



**IL2:** proteina globulare (14-17 kD) con 4 domini ad  $\alpha$ -elica

- **Prodotta dai linfociti T CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>)** in seguito al riconoscimento dei complessi **peptide-MHC II** (MHC I) e **CD28/B7**
- Produzione transitoria con picco di secrezione intorno alle **8-12 ore**
- Secreta a livello della **sinapsi immunologica** dove vanno anche a concentrarsi i recettori
- Stimolazione autocrina e paracrina

# Trasduzione del segnale via IL-2R

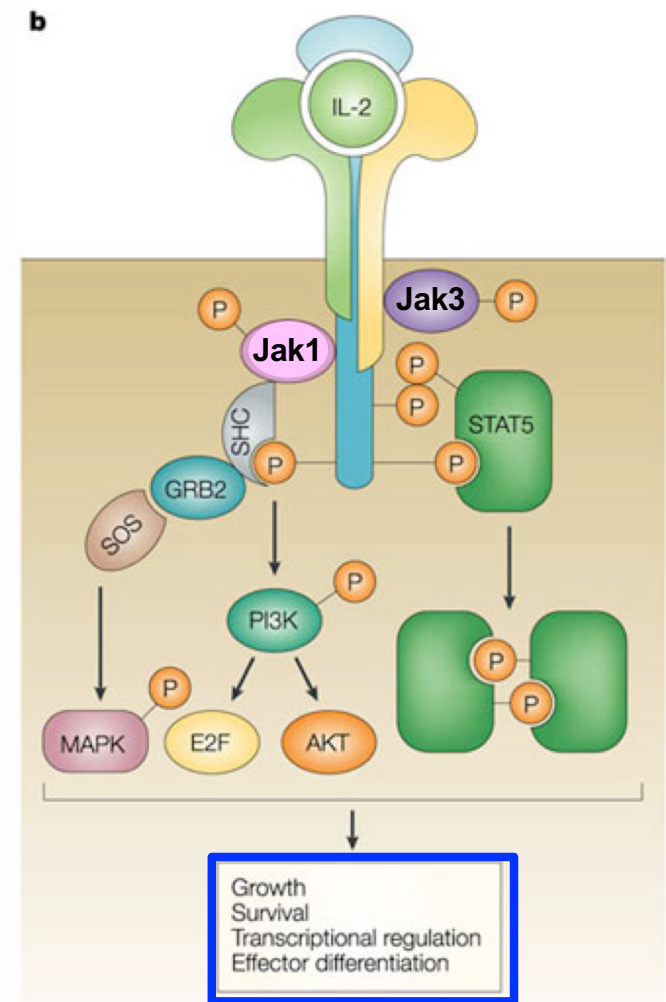


The high-affinity interleukin-2 receptor (IL-2R) consists of **three subunits**:

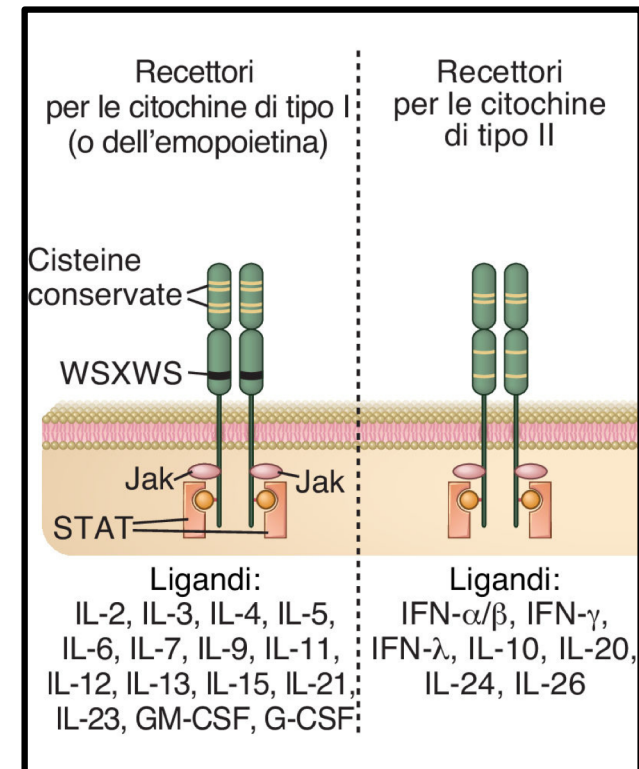
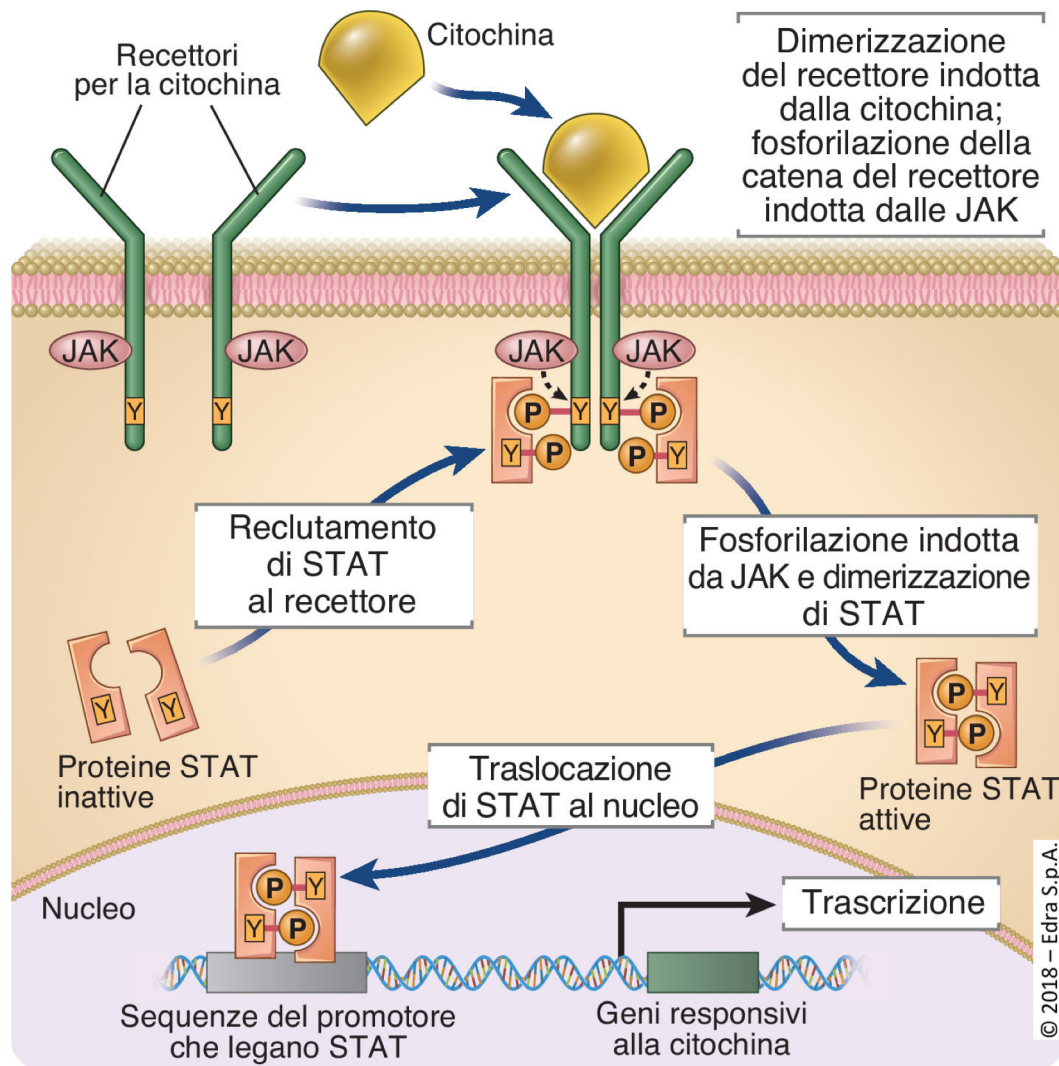
1. the  **$\alpha$ -chain** of the IL-2R (IL-2R $\alpha$ ; also known as CD25),
2. the  **$\beta$ -chain** of the IL-2R (IL-2R $\beta$ ; also known as CD122)
3. the common cytokine-receptor  **$\gamma$ -chain** ( $\gamma c$ ; also known as CD132).

It is thought that in the absence of IL-2, these subunits are not pre-assembled on the surface of an IL-2R-expressing T cell.

The **binding of IL-2** to **IL-2R $\alpha$**  drives the association of this subunit with **IL-2R $\beta$**  and the  **$\gamma c$**  to form a stable heterotrimer, which then leads to the initiation of signal transduction. JAK3 molecules that are associated with the  $\gamma c$ , and JAK1 molecules that are associated with IL-2R $\beta$ , phosphorylate key tyrosine residues in the cytoplasmic tail of IL-2R $\beta$ , the  $\gamma c$  and the JAK molecules themselves. This amplifies the association of these tyrosine kinases and induces the association of the adaptor SHC (SRC-homology-2-domain-containing transforming protein C), and STAT5 with the cytoplasmic tail of IL-2R $\beta$ . The complexed SHC allows activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)- and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT-signalling pathways. Tyrosine residues in STAT5 are also phosphorylated, leading to the dimerization of STAT5 and its translocation to the nucleus where it regulates STAT5-responsive genes. GRB2, growth-factor-receptor-bound protein 2; SOS, son of sevenless homologue.



# Meccanismi di trasduzione dei recettori per citochine di tipo I e II : la via JAK/STAT

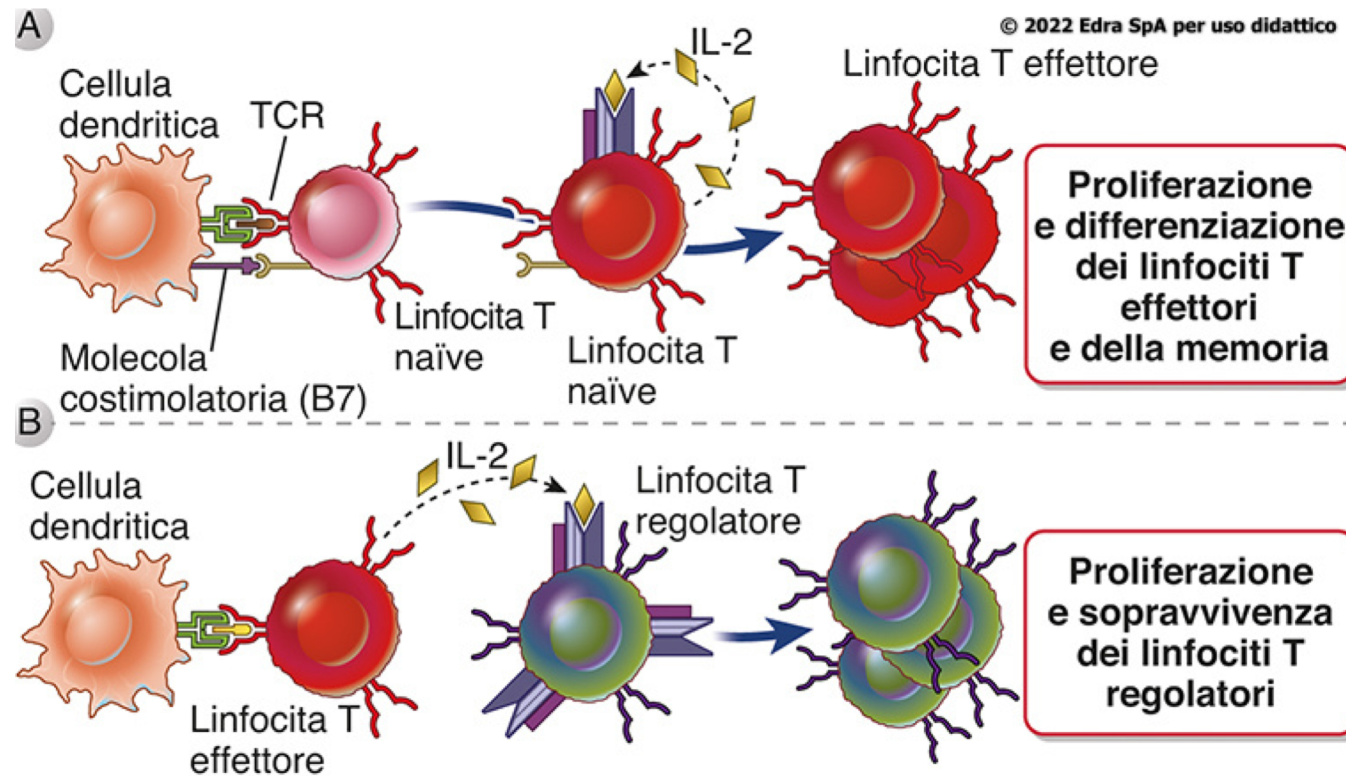


**JAK** (Janus activated kinase; **tyr chinasi**): **Jak 1, 2, 3 e Tyk2**

**STAT** (signal transducer and activator of transcription; **fattori di trascrizione**):

**STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6**

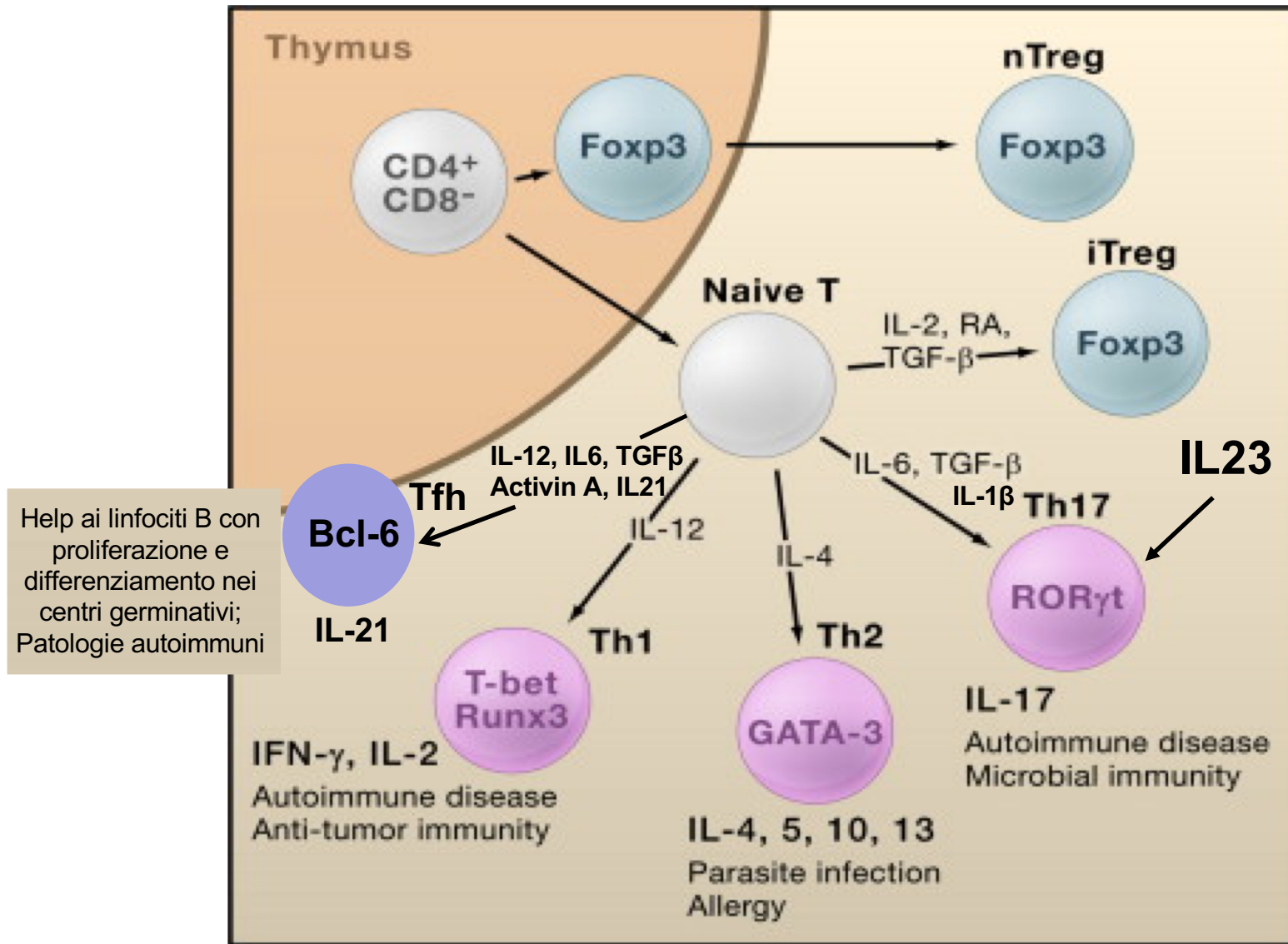
# Attività biologiche dell'IL-2



- **Proliferazione, sopravvivenza e differenziamento dei linfociti T:**
  - espressione delle **ciclina** e **degradazione di p27** (entrata in fase S);
  - espressione **Bcl-2**;
  - aumenta la produzione di citochine effettrici (es. **IFN- $\gamma$**  e **IL-4**)
- **Sopravvivenza e funzione dei linfociti T regolatori ( $T_{reg}$ ):** espressione costitutiva del **CD25**



# Il differenziamento dei linfociti T CD4+ 'naive' a cellule effettrici con funzioni distinte è indotto da condizioni specifiche

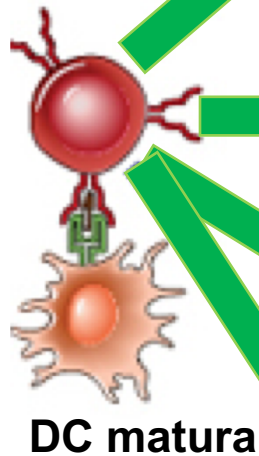


Differentiation of Naive CD4+ T Cells into Tregs or Effector T Cells. Cytokines and transcription factors that promote the differentiation of naive T cells into Tregs or effector T cells are shown. The transcription factors T-bet and Runx3, GATA3, RORγt or Bcl-6 are required for the differentiation of naive T cells into Th1, Th2, Th17 or Thf cells, respectively. nTreg, natural Treg; iTreg, induced Treg; RA, retinoic acid.

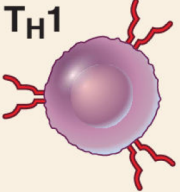
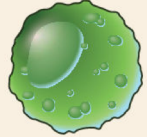
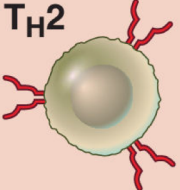
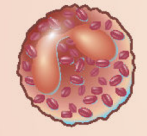
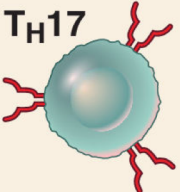
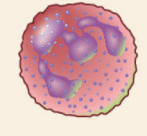
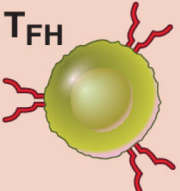
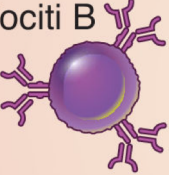
# Differenziamento linfociti T CD4<sup>+</sup>

## Sottopopolazioni di linfociti T CD4<sup>+</sup>: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 e T<sub>FH</sub>

Linfocita T  
CD4<sup>+</sup> naive

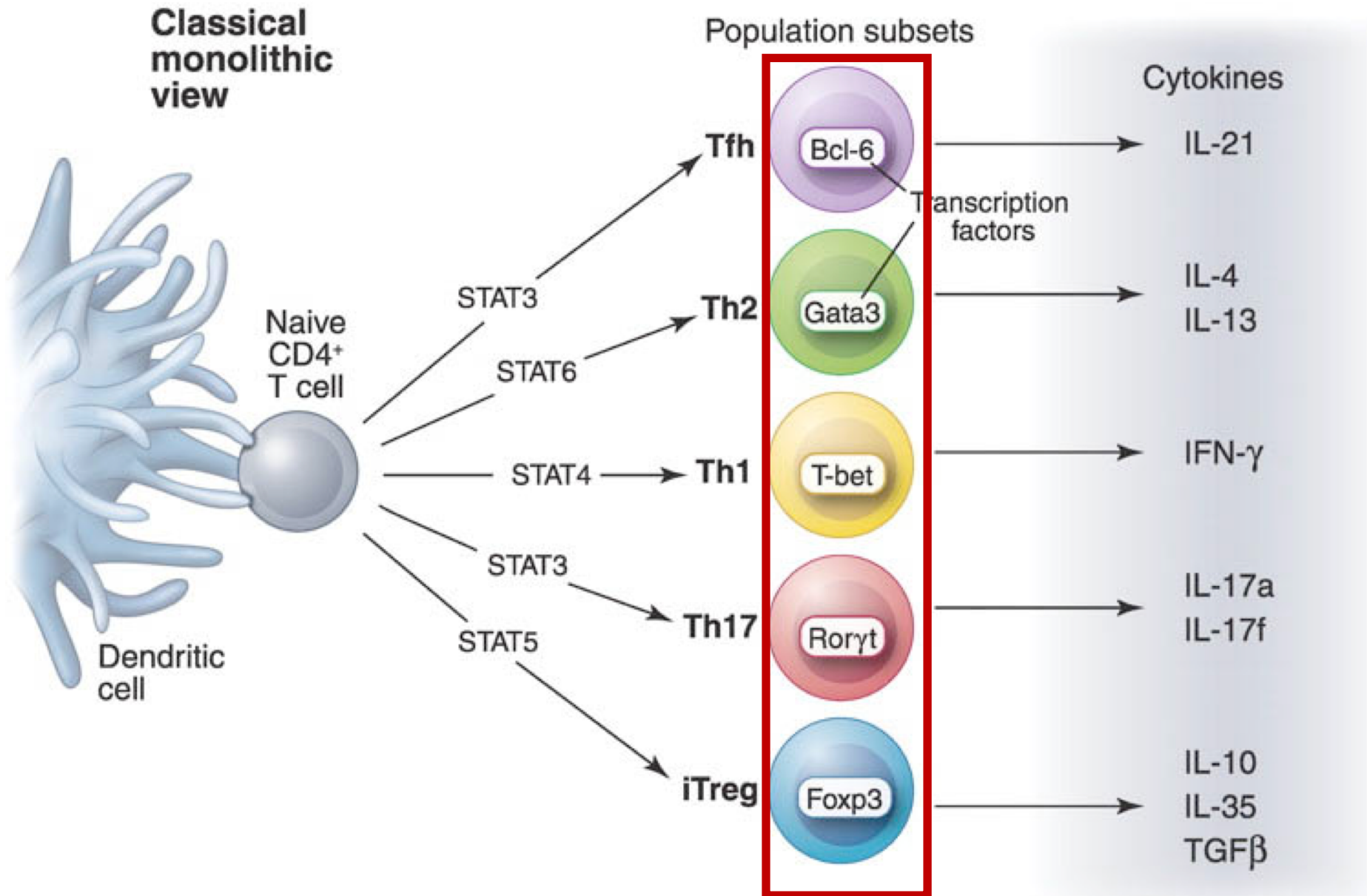


DC matura

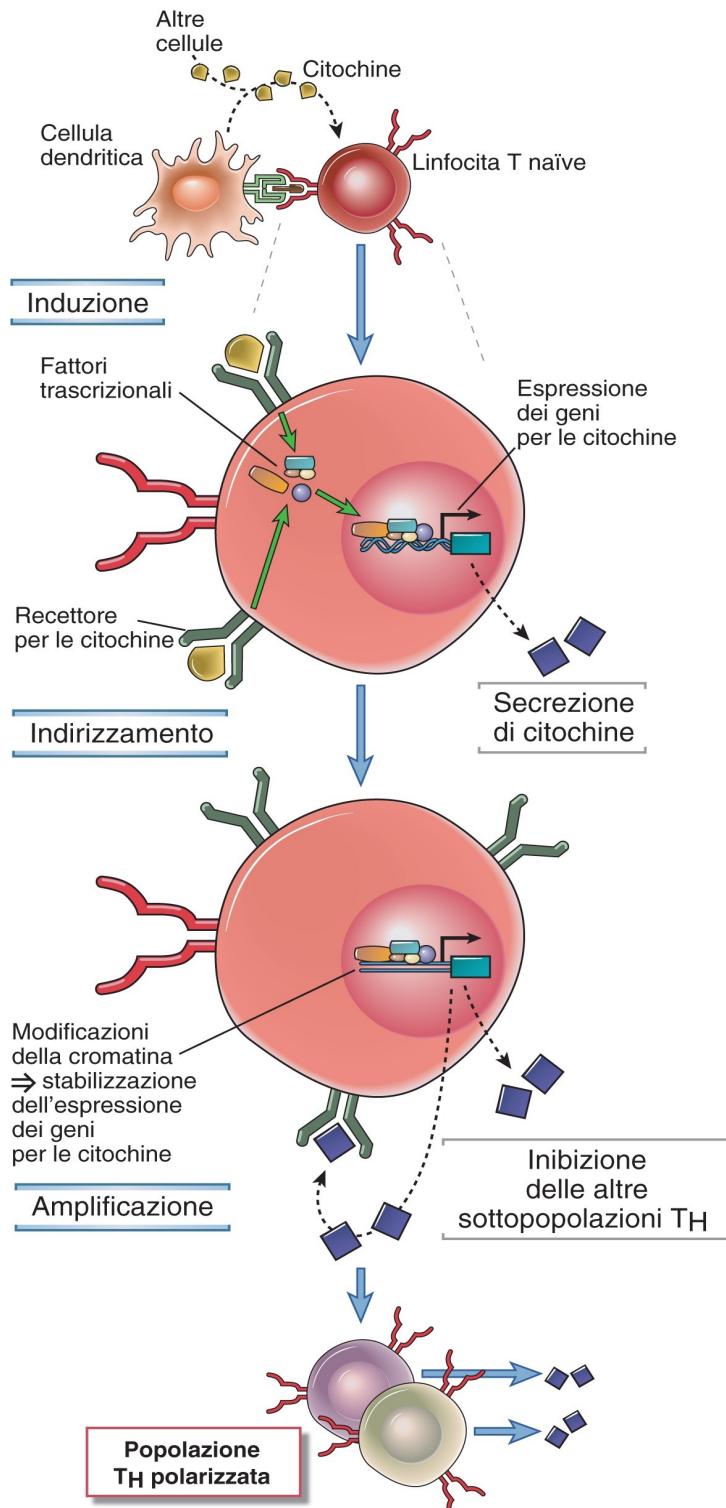
Linfociti T effettori	Citochine caratteristiche	Principali cellule bersaglio	Principali reazioni immunitarie	Difesa contro	Ruolo in patologia
 T <sub>H</sub> 1	IFN- $\gamma$	 Macrofagi	Attivazione dei macrofagi (M1)	Patogeni intracellulari	Autoimmunità; infiammazione cronica
 T <sub>H</sub> 2	IL-4 IL-5 IL-13	 Eosinofili	Attivazione degli eosinofili e dei mastociti; attivazione alternativa dei macrofagi (M2)	Elminti	Allergia
 T <sub>H</sub> 17	IL-17 IL-22	 Neutrofili	Reclutamento e attivazione dei neutrofili	Batteri extracellulari e funghi	Autoimmunità; infiammazione
 T <sub>FH</sub>	IL-21 (e IFN- $\gamma$ o IL-4)	 Linfociti B	Produzione di anticorpi	Patogeni extracellulari	Autoimmunità (autoanticorpi)

Help ai linfociti B con proliferazione e differenziamento nei centri germinativi; induzione della maturazione dell'affinità degli anticorpi e scambio dell'isotipo

# Fattori di trascrizione specifici (master regulators) dei subsets linfocitari T CD4+



# Differenziamento o polarizzazione dei T helper



- 1. Induzione:** attivazione di fattori trascrizionali importanti per l'espressione dei geni delle citochine caratteristiche (ruolo del **TCR/CD28** e **citochine** prodotte nel microambiente circostante)
- 2. Indirizzamento (*commitment*):** modificazioni epigenetiche irreversibili dei geni espressi
- 3. Amplificazione:** le citochine prodotte promuovono lo sviluppo di una specifica popolazione Th **inibendo il differenziamento delle altre sottopopolazioni**

# Linfociti T<sub>H</sub>1

Indotti da **virus** e **batteri intracellulari** (**micobatteri** e **Listeria**) o **parassiti** come **Leishmania** che infettano macrofagi e DC.

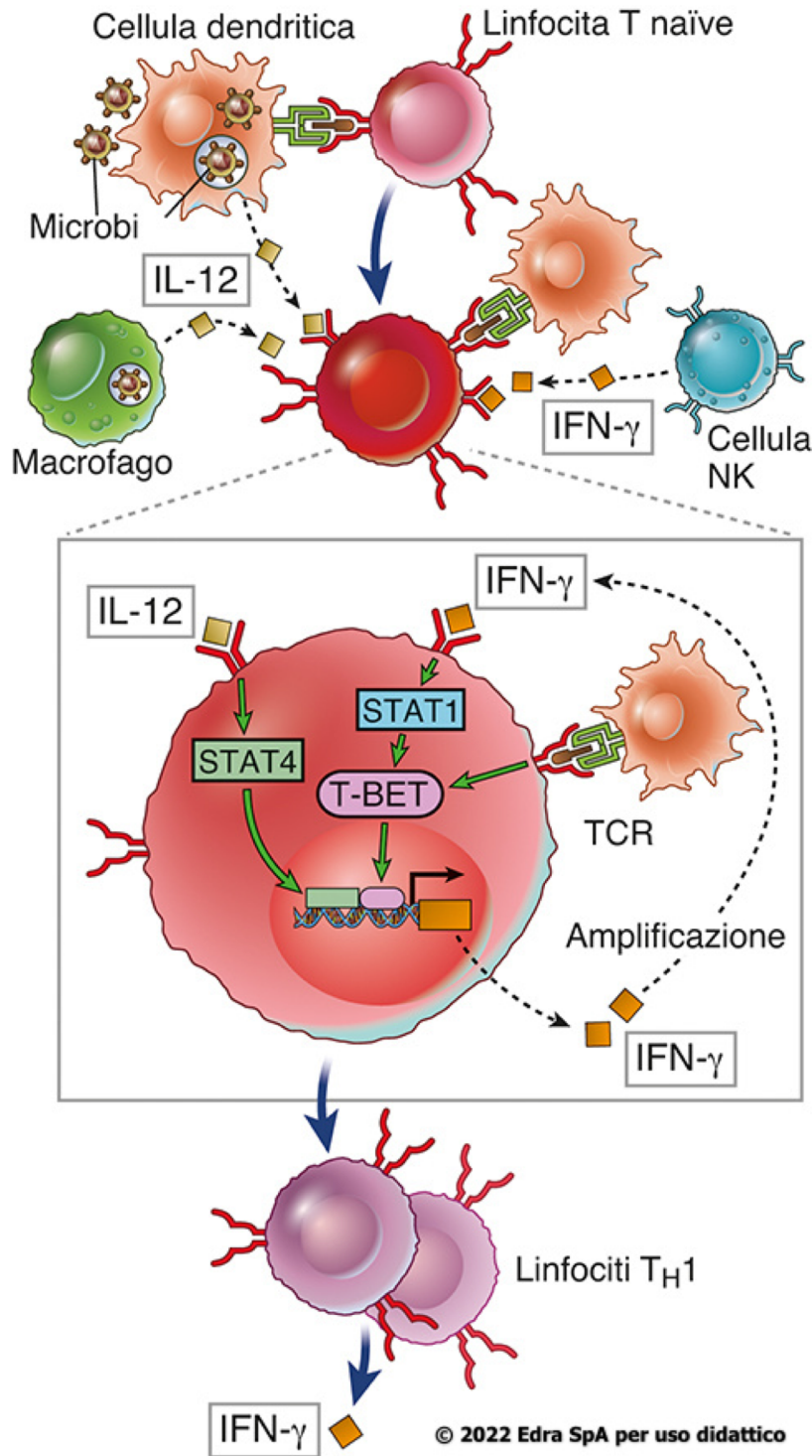
**Citochine differenzianti: IL12, IFN- $\gamma$ , IFN tipo I e IL18**

**IL12**  $\rightarrow$  STAT4  $\rightarrow$  T-bet e IFN- $\gamma$

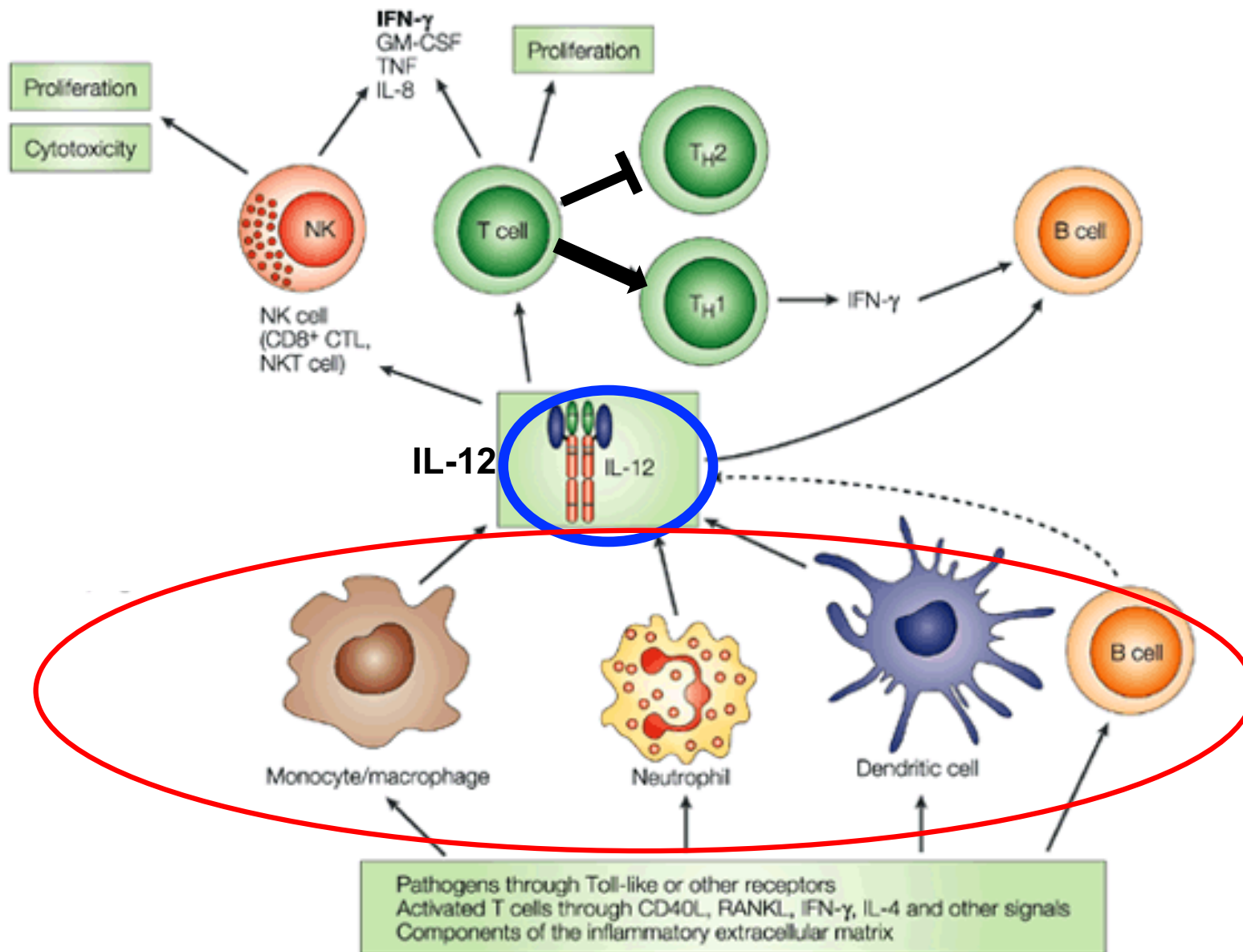
**IFN- $\gamma$**   $\rightarrow$  STAT1  $\rightarrow$  T-bet

**T-bet:** fattore di trascrizione della famiglia T-box

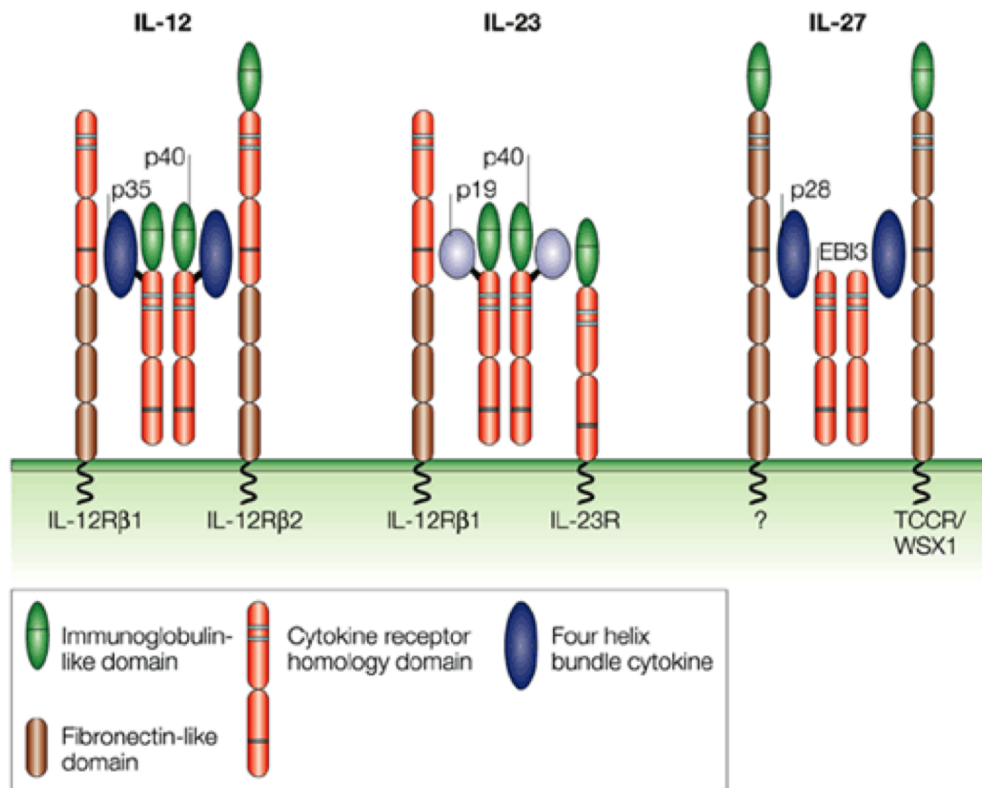
Coinvolti nella patogenesi di malattie infiammatorie croniche ed autoimmuni (Diabete di tipo I, psoriasi, sclerosi multipla, malattie infiammatorie croniche dell'intestino)



# IL-12 nel differenziamento Th1

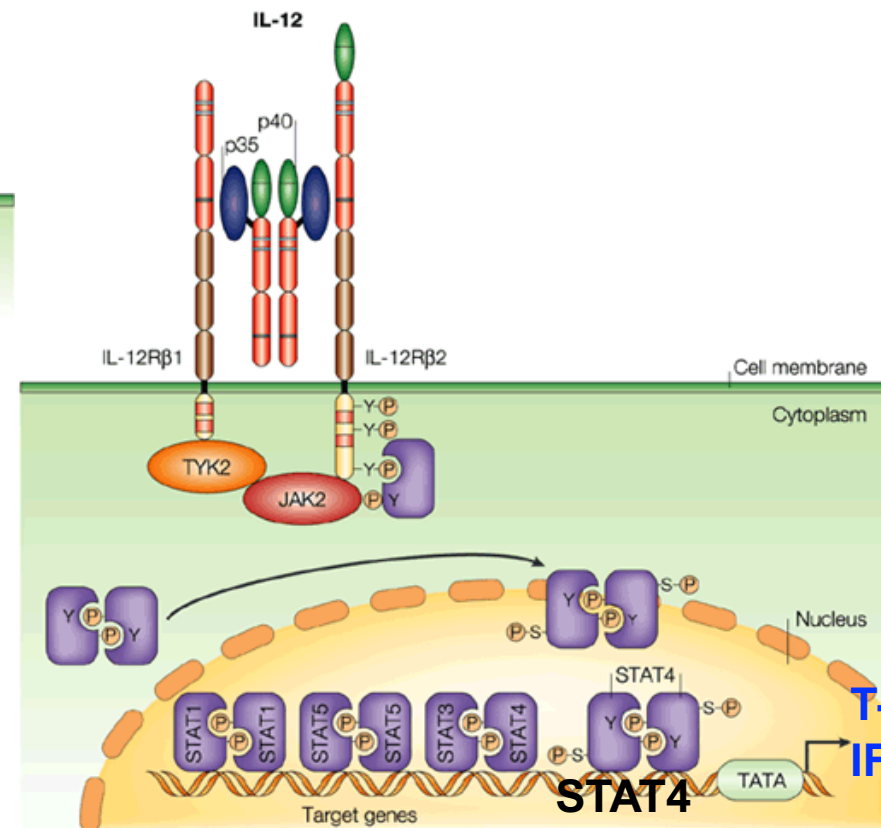


**IL12:** citochina di tipo I,  
eterodimero **p35 e p40**



Nature Reviews | Immunology

# IL12R (Recettore di tipo I)



Nature Reviews | Immunology

# I linfociti Th1 producono IFN $\gamma$

IFN $\gamma$  è una citochina prodotta anche da:

Linfociti T CD8<sup>+</sup>

Cellule NK

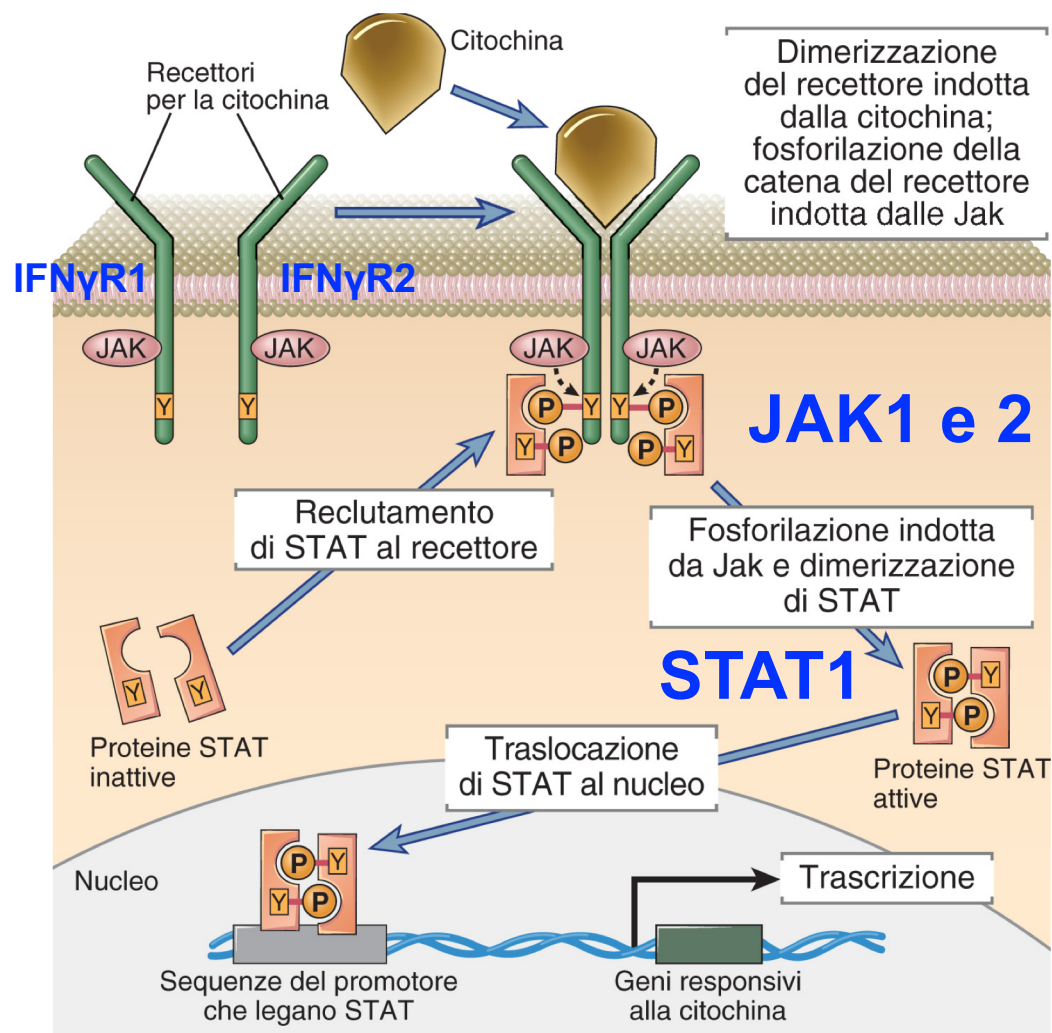
Il recettore è costituito dalle catene IFN $\gamma$ R1 e IFN $\gamma$ R2 che eterodimerizzano quando IFN $\gamma$  si lega ed attivano Jak1 e 2.

STAT1 è reclutato, fosforilato, dimerizza e trasloca nel nucleo.

Tra i geni indotti da STAT1:

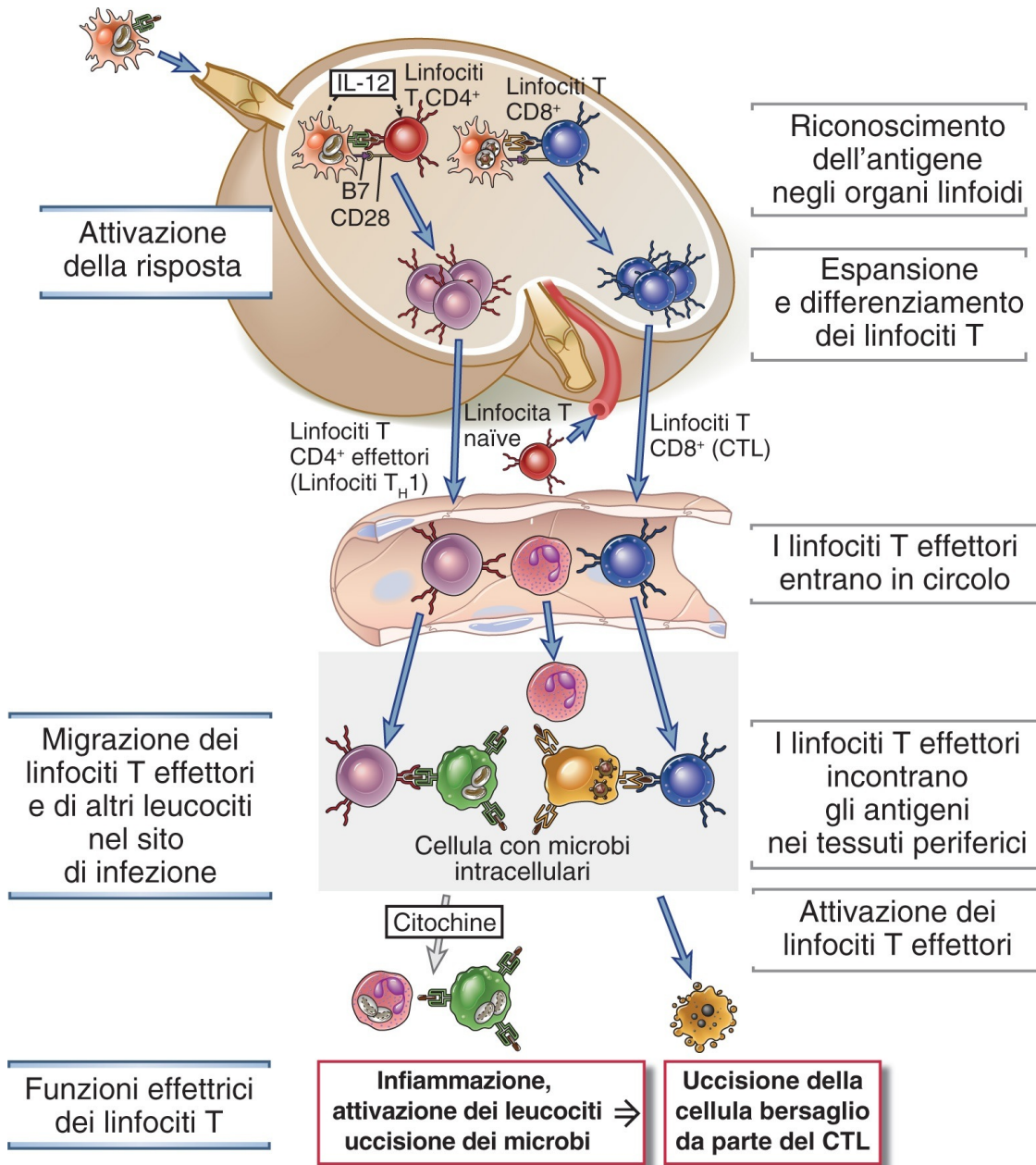
-CXCR3 (ligandi: CXCL9, 10 e 11)

-CCR5 (ligandi: (MIP1  $\alpha$  e  $\beta$ ; RANTES ovvero CCL3, 4 e 5)





# T<sub>H</sub>1 e reclutamento nei siti infiammatori

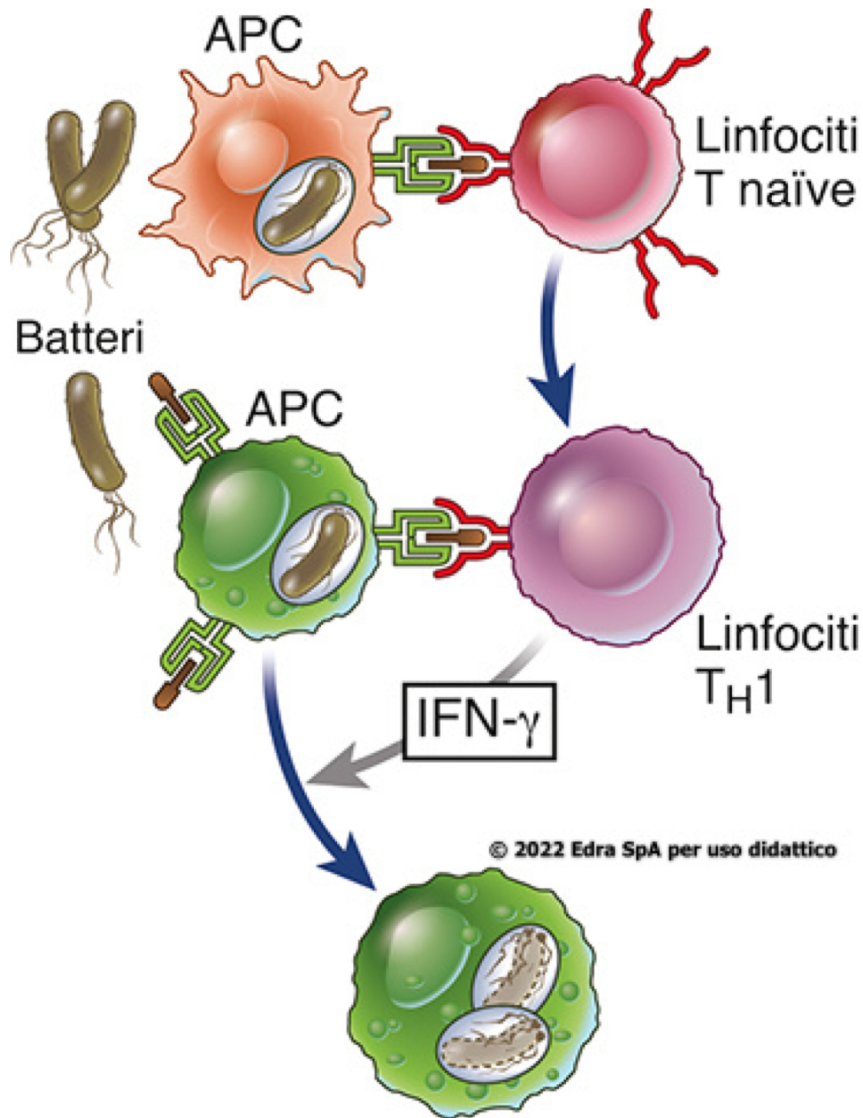


- **Reclutamento:** La produzione delle chemochine:

CXCL9, 10, 11 (ligandi di CXCR3) e MIP1  $\alpha$  e  $\beta$ ; RANTES (ligandi di CCR5) da parte di macrofagi, NK e cellule endoteliali (**forte risposta innata**) recluta i T<sub>H</sub>1 (non i T<sub>H</sub>2) che esprimono CXCR3 e CCR5 che vengono così richiamati nel sito di infezione.

- **Extravasazione** e permanenza nel sito infiammato perchè VLA-4, VLA-5 legano la fibronectina e CD44 lega l'acido ialuronico nella matrice extracellulare.

# Funzioni dei T<sub>H</sub>1



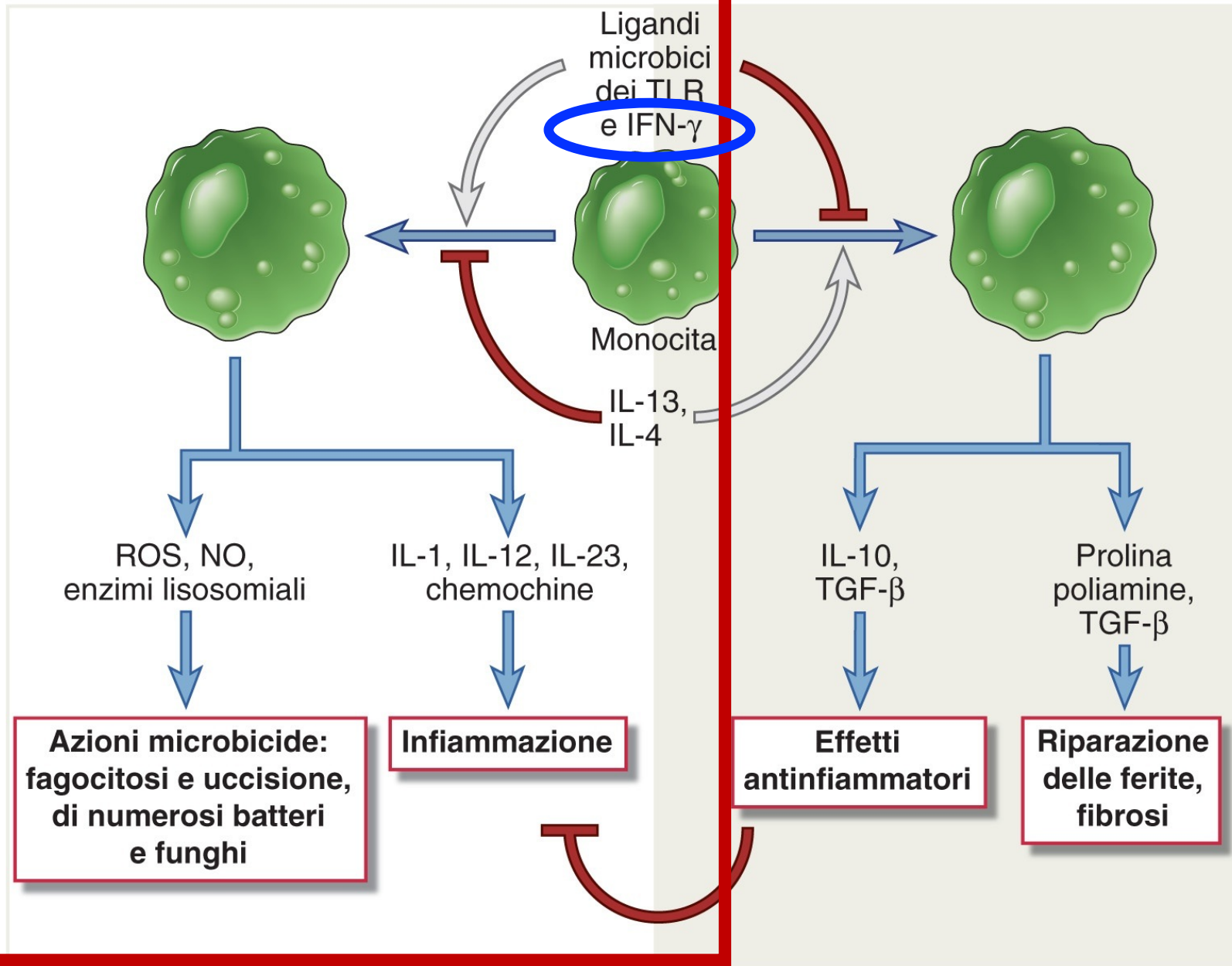
**Attivazione classica  
dei macrofagi (potenziamento  
dell'attività microbica)**

## IFN- $\gamma$ :

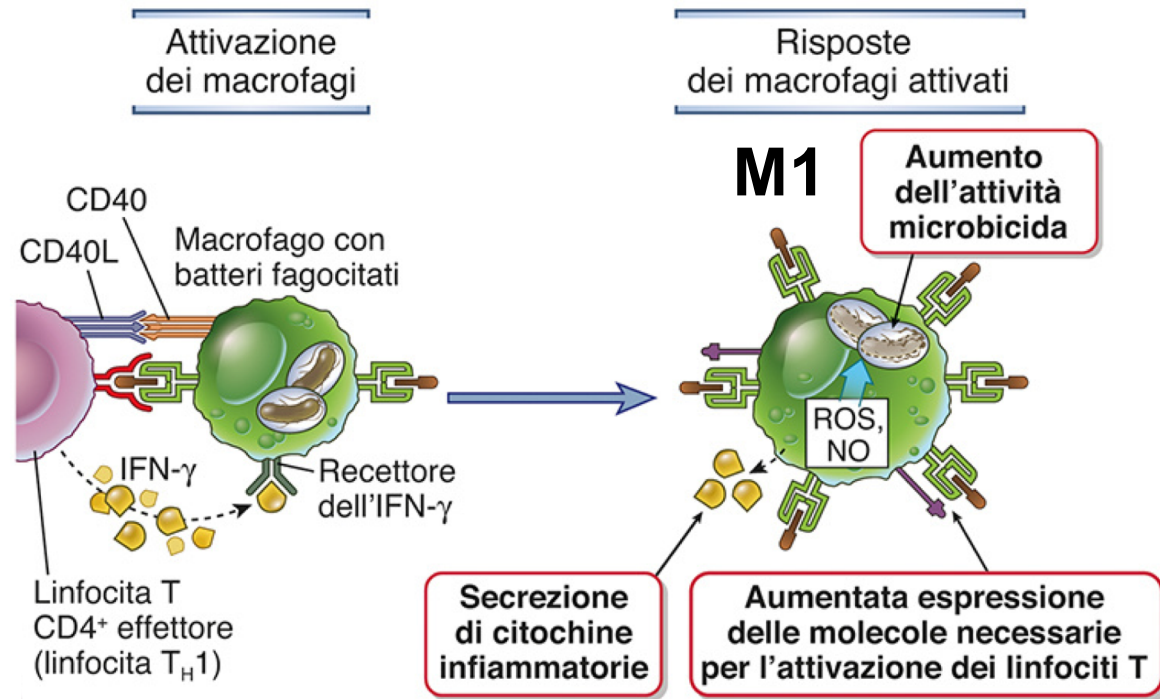
- induce **attivazione classica dei macrofagi (M1)** che eliminano i microbi fagocitati
- promuove differenziazione dei linfociti T CD4+ a Th1 inibendo lo sviluppo dei Th2 e Th17
- Stimola l'espressione di molecole coinvolte nella presentazione antigenica (MHC; B7 e subunità del proteasoma)
- Induce macrofagi e DC a produrre citochine e chemochine che amplificano la risposta infiammatoria (TNF- $\alpha$ ; IL-6)

## Attivazione classica dei macrofagi (M1)

## Attivazione alternativa dei macrofagi (M2)



# Attivazione classica dei macrofagi da parte dei T<sub>H</sub>1



## Risposta dei macrofagi

Produzione di ossido nitrico, produzione di enzimi lisosomiali, specie reattive dell'ossigeno

Secrezione delle citochine (TNF, IL-1, IL-12) e delle chemochine

Aumentata espressione delle molecole costimolatorie B7, delle molecole MHC

## Ruolo nell'immunità cellulo-mediata

Uccisione dei microbi nei fagolisosomi (funzione effettrice dei macrofagi)

TNF, IL-1, chemochine: reclutamento dei leucociti (infiammazione)  
IL-12: differenziazione dei linfociti T<sub>H</sub>1, produzione dell'IFN- $\gamma$

Aumentata attivazione dei linfociti T (amplificazione della risposta T)

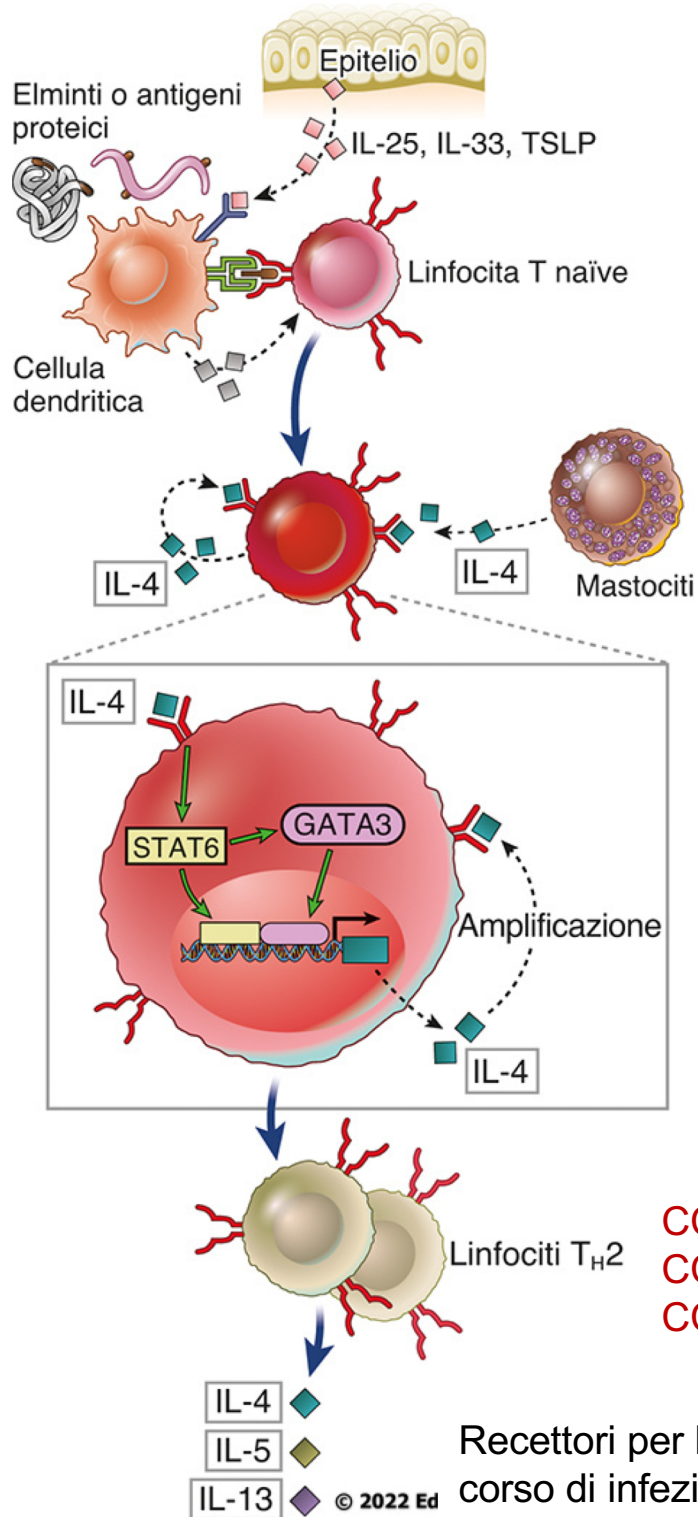
# Linfociti T<sub>H</sub>2

Indotti da **elminti** o **allergeni**

**IL-4** → **STAT6** → **GATA3**

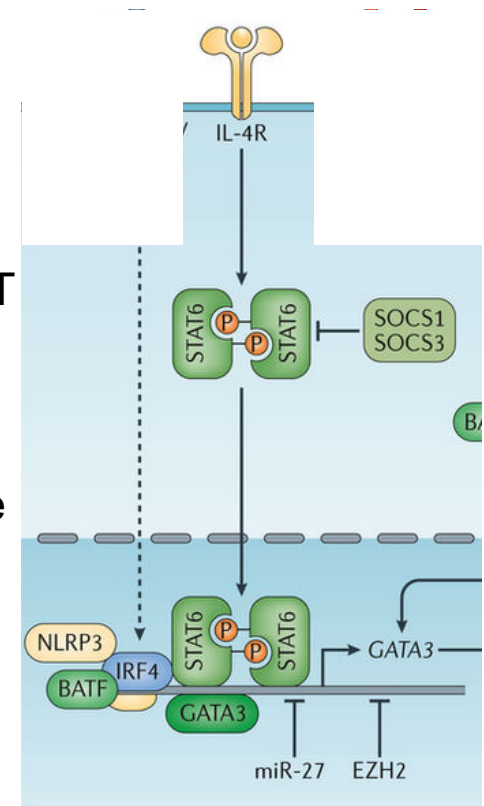
**GATA3** → **IL-4, IL-5, IL-13**

**GATA3** inibisce l'espressione del IL-12R e perciò blocca il differenziamento a T<sub>H</sub>1 e la produzione di IFN- $\gamma$

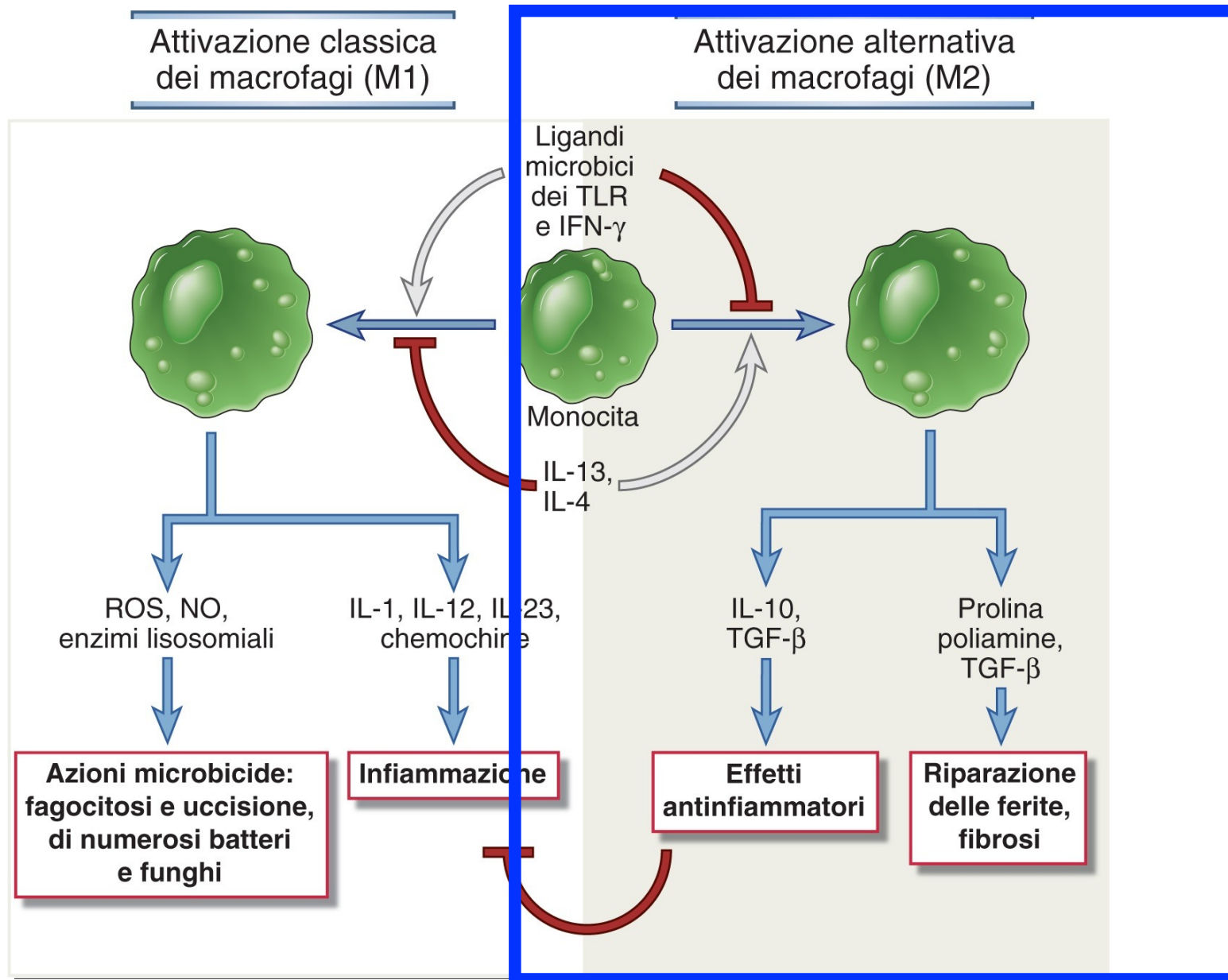


Recettori per le chemochine espresse da mucose in corso di infezioni da elminti o durante reazioni allergiche

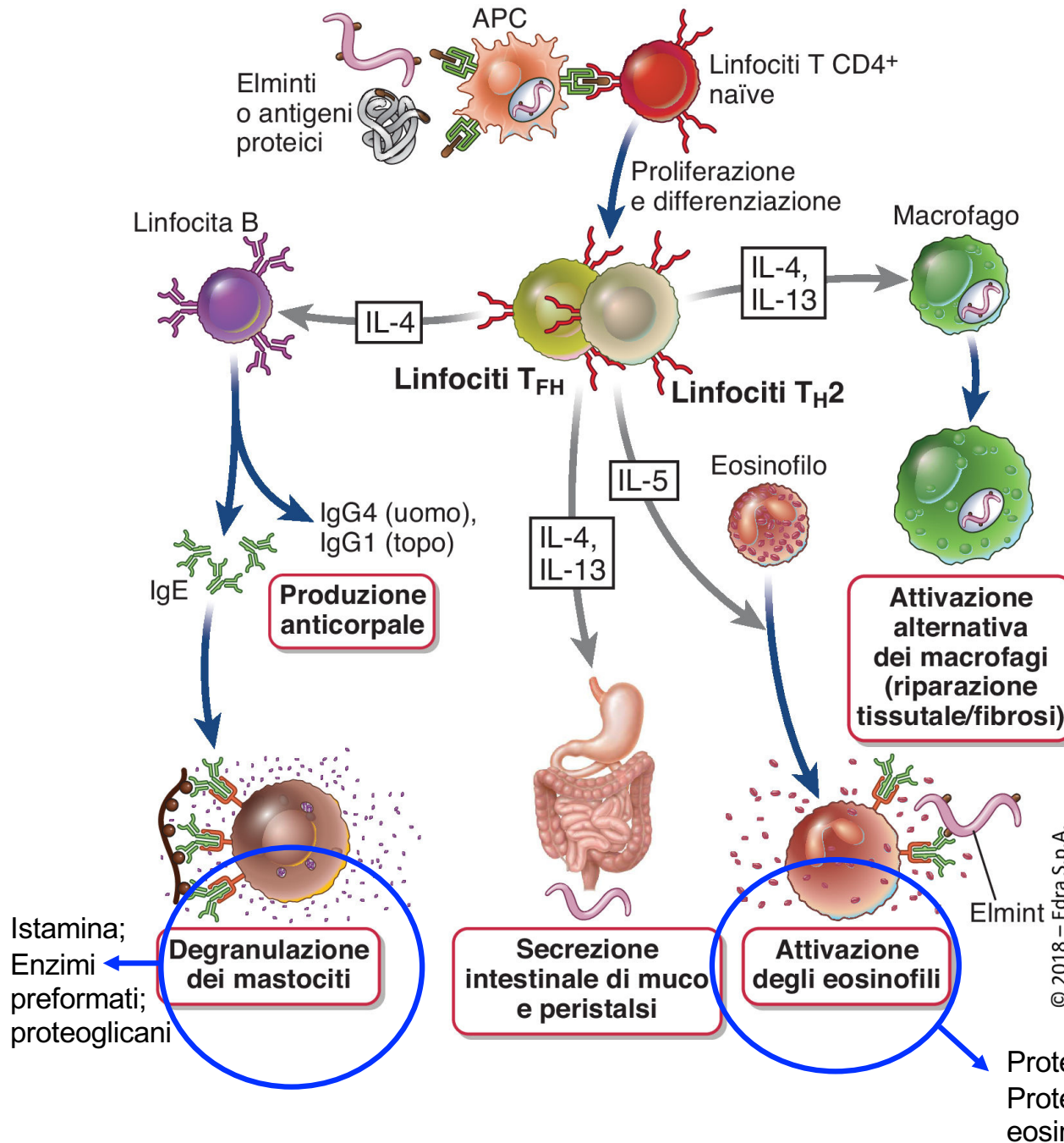
- **IL-4R**: Recettore di tipo I con catena  $\gamma$  comune ( $\gamma_c$ )
- Trasduzione via JAK/STAT con **JAK1 e 3** e **STAT6**
- **STAT6** promuove la trascrizione di **GATA3**, che collabora con **STAT5** (attivato da IL-2) per trascrivere i geni per **IL-4, IL-5, IL-13**



# Linfociti T<sub>H</sub>2 inducono l'attivazione alternativa dei macrofagi (M2)



# I linfociti T<sub>H</sub>2



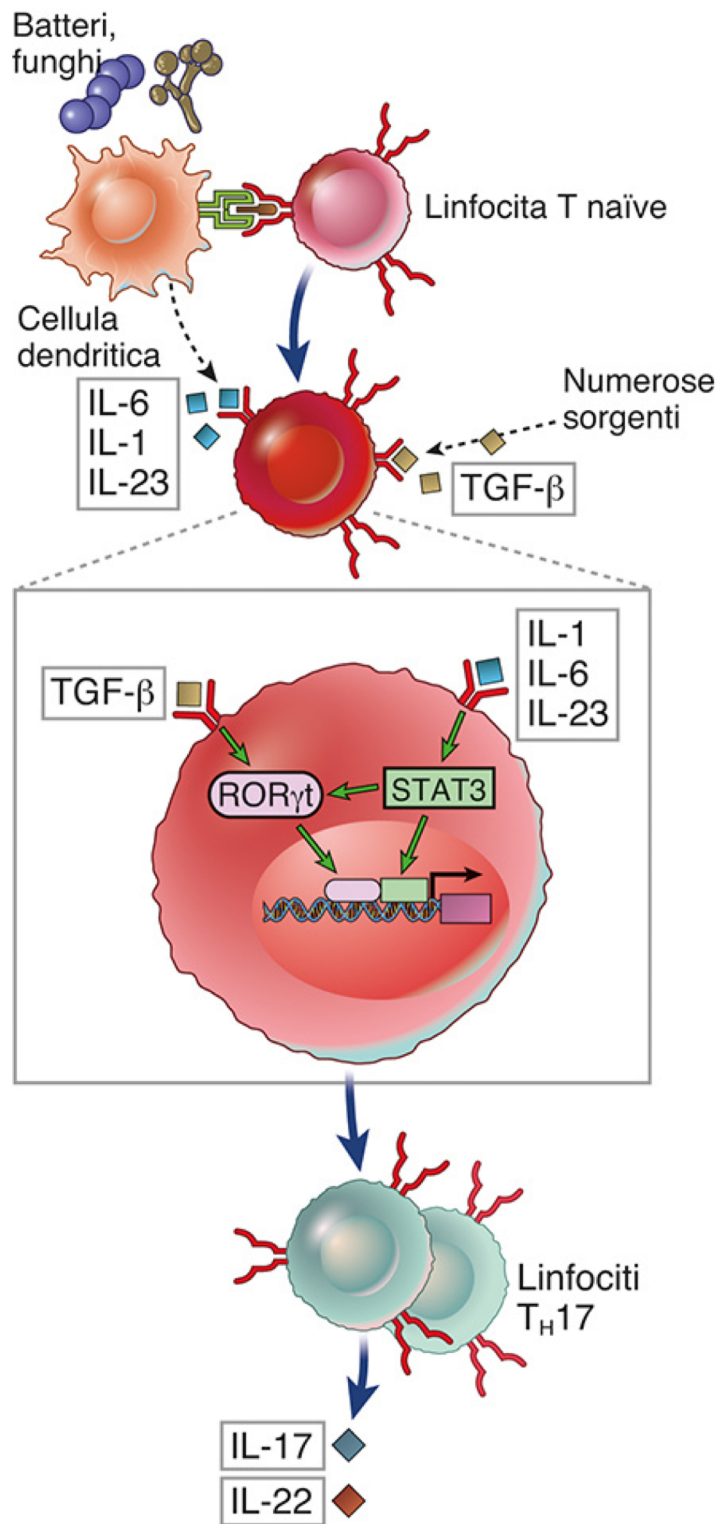
Funzioni dei Th2. I linfociti T CD4<sup>+</sup> naive Th2 dopo essersi differenziati in Th2 secernono IL-4, IL-5 e IL-13. L'IL-4 (e IL-13) che agiscono sui linfociti B per stimolare la produzione di anticorpi, quali le IgE, che si legano ai mastociti e agli eosinofili. Negli organi linfoidi, il principale supporto alla produzione di anticorpi è fornito dalle cellule T helper follicolari T<sub>fh</sub> che producono citochine Th2 e non dalle cellule Th2 classiche. L'IL-5 attiva gli eosinofili, una risposta importante per la difesa contro le infezioni da elminti. L'IL-4 e IL-13, coinvolte nell'immunità a livello delle barriere mucose, causano l'attivazione dei macrofagi attraverso la via alternativa e inibiscono l'attivazione classica contrastando l'azione dei linfociti Th1.

# Linfociti T<sub>H</sub>2

producono IL4, IL5 e IL13

- Sono coinvolti nelle risposte alle infezioni da elminti o nelle infiammazioni allergiche (**mucose**)
- **Attivano gli eosinofili:** IL-5 stimola la proliferazione e la differenziazione degli eosinofili che sono indotti a degranulare (es. nell'immunità contro gli elminti rilasciano la proteina basica e la proteina cationica maggiore)
- **Attivazione mastociti:** IL-4 stimola lo switch a IgE che induce direttamente il rilascio di amine vasoattive (**istamina**), **TNF, IL-1, IL-6** etc
- **Immunità di barriera:** IL-13 stimola la produzione di muco, IL-4 stimola la peristalsi intestinale
- **Attivazione alternativa dei macrofagi (M2)** che producono **TGF- $\beta$ , PDGF,** e **IL-10** → rimodellamento e riparazione tissutale con stimolazione di collagene (fibrosi)





## Differenziamento dei T<sub>H</sub>17

T<sub>H</sub>17 stimolati da citochine proinfiammatorie prodotte da DC attivate da batteri extracellulari e funghi (IL-6, IL-1) o dalla fagocitosi di corpi apoptotici

IL-6, IL-1 in presenza di TGF- $\beta$  importanti per il differenziamento

IL-21 per proliferazione/amplificazione

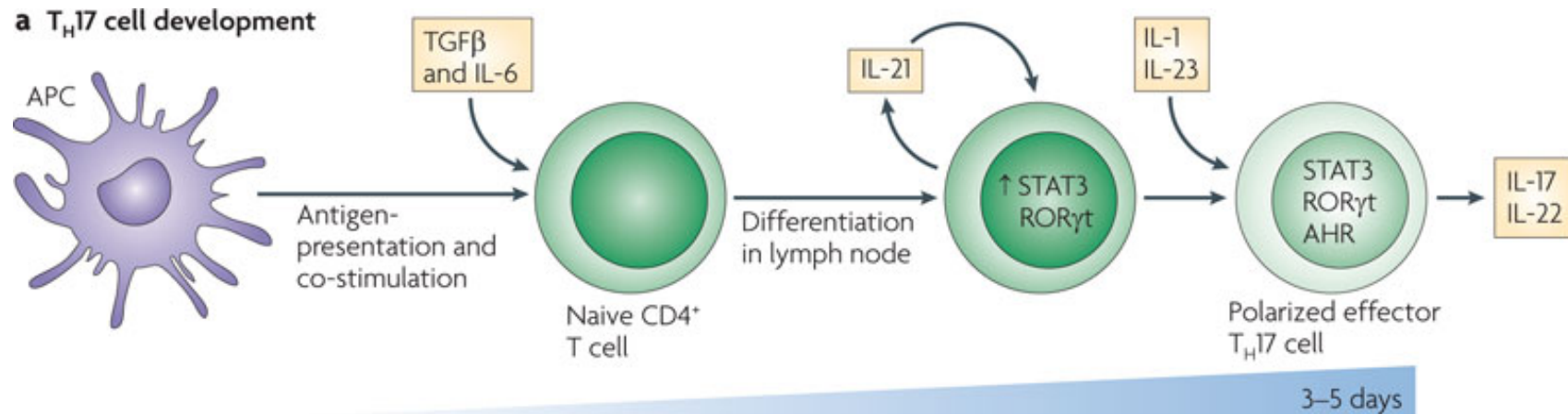
IL-23 coinvolta nella proliferazione e mantenimento

ROR $\gamma$  (TGF- $\beta$ ) e STAT3 (IL-6 e IL-21) importanti per la generazione dei Th17

**Sindrome di Giobbe: mutazioni di STAT3**  
 → no T<sub>H</sub>17 → aumentata sensibilità ad infezioni batteriche e fungine

IFN- $\gamma$  (T<sub>H</sub>1) e IL-4 (T<sub>H</sub>2) **inibiscono** il differenziamento dei T<sub>H</sub>17

# I linfociti T<sub>H</sub>17



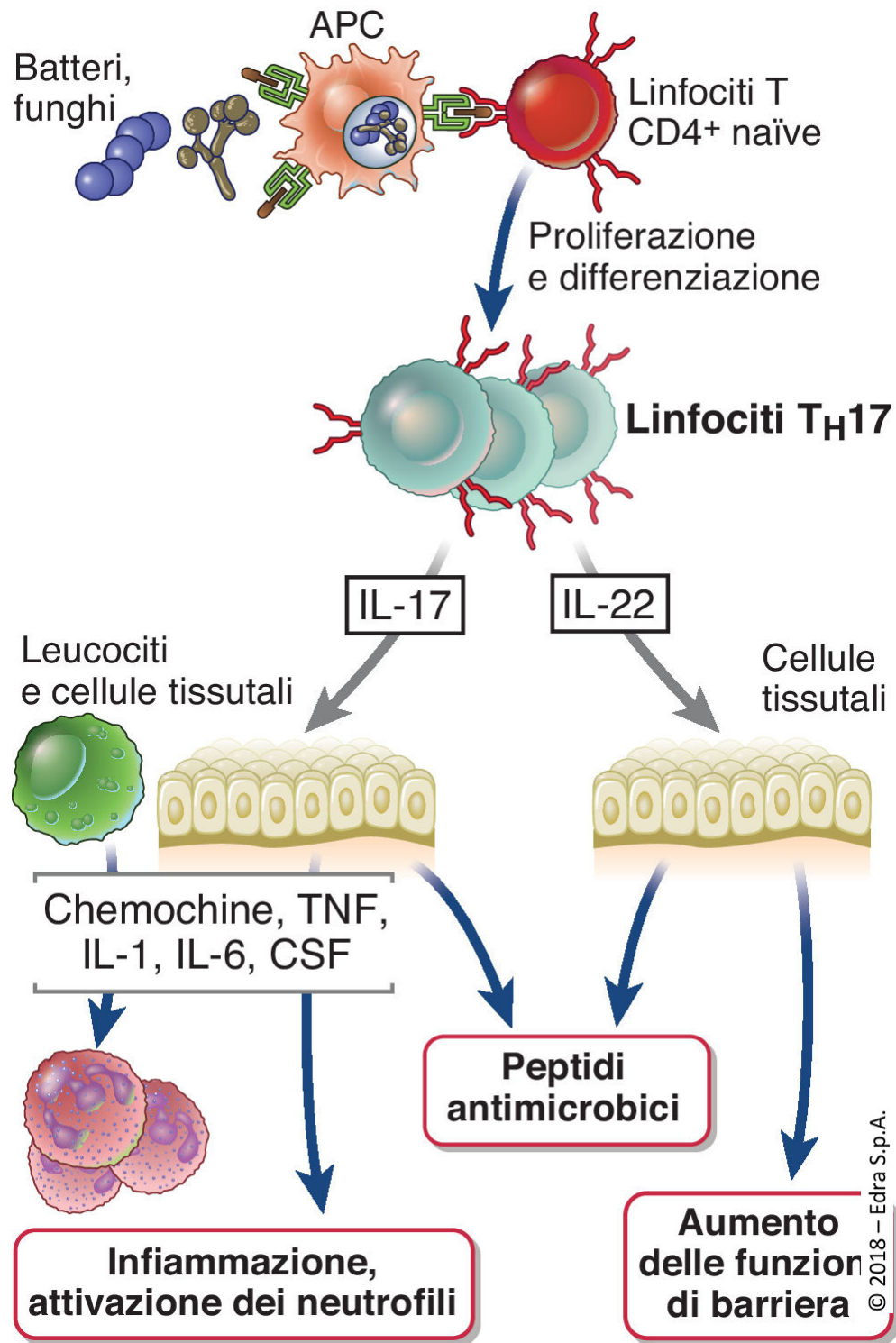
**Famiglia di sei membri: IL-17A-F**, la **IL17A** è quella principalmente coinvolta nelle funzioni dei T<sub>H</sub>17

## IL-17A:

1. Stimola produzione di **G-CSF** e di **GM-CSF** e di **IL-8/CXCL8** → aumenta la generazione e il reclutamento dei **neutrofili**
2. Stimola la produzione di **TNFα**, **IL1** e **IL6** → infiammazione

## IL-22:

1. Stimola le cellule epiteliali a produrre peptidi anti-microbici (**defensine** e **catelicidine**) e ne aumenta la proliferazione e sopravvivenza e capacità di rinnovamento

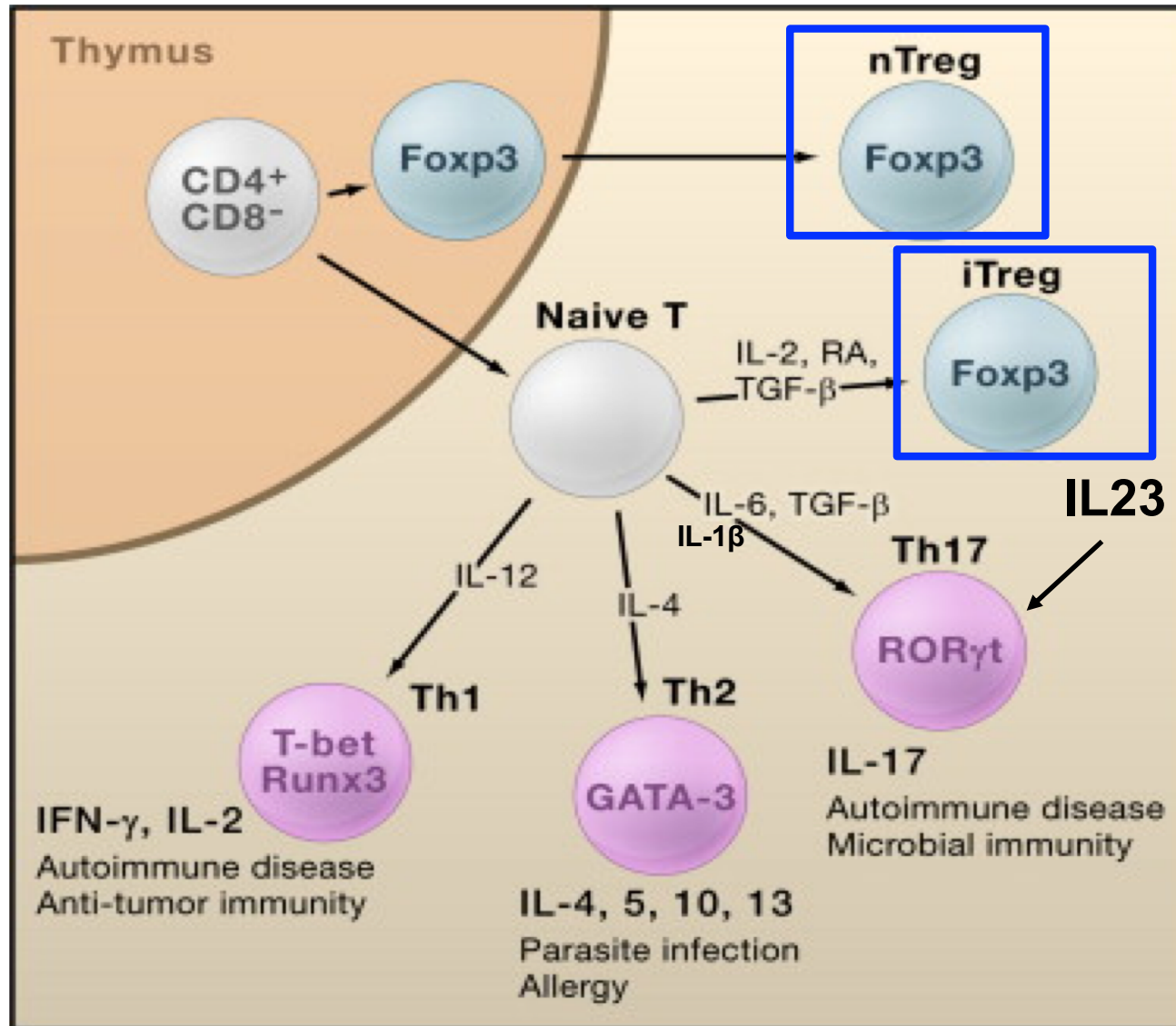


## Funzioni dei T<sub>H</sub>17

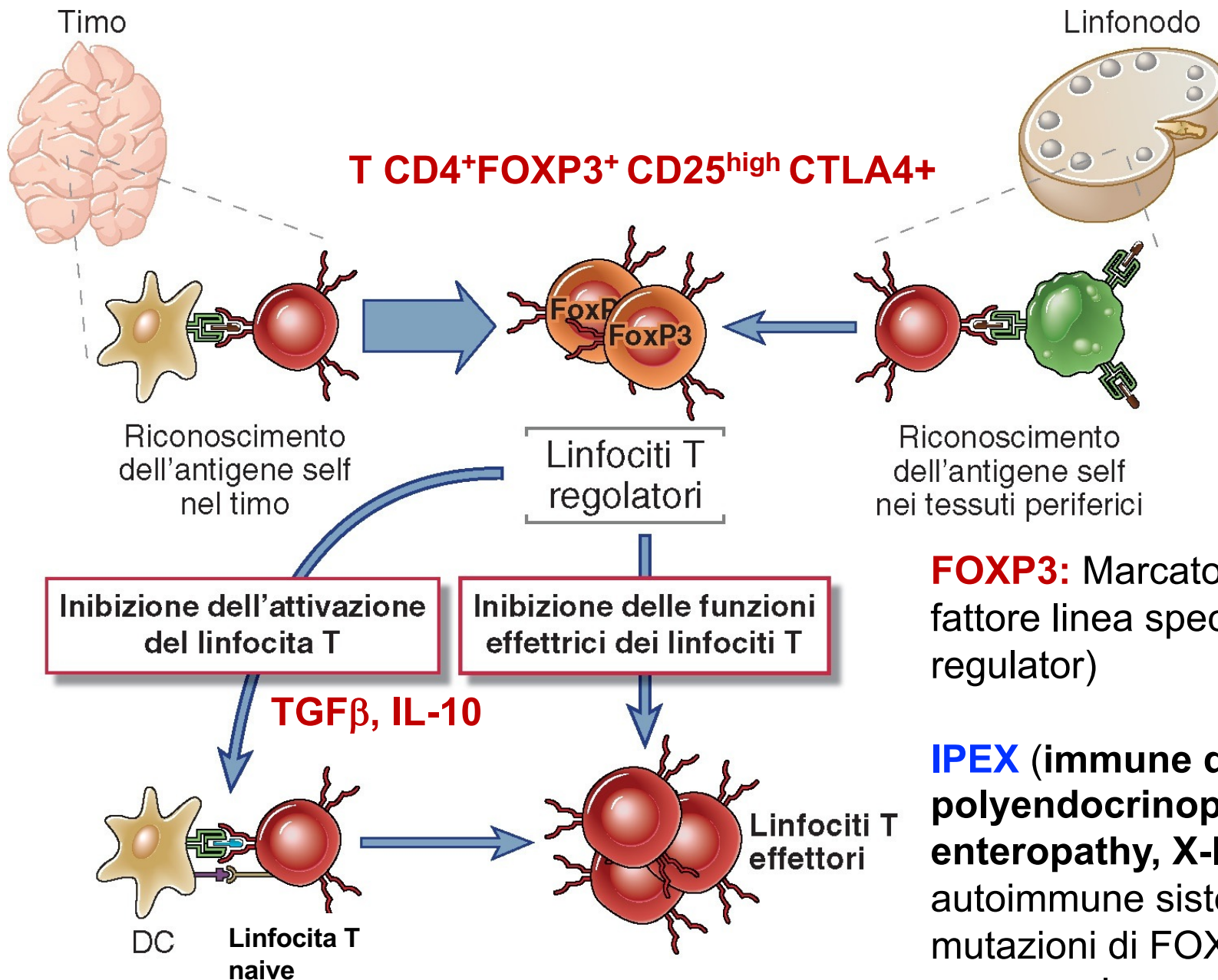
- Difesa contro batteri extracellulari e funghi inducendo infiammazione soprattutto neutrofilica.
- Neutrofili fagocitano ed eliminano i batteri extracellulari ed i funghi.
- I Th17 esprimono **CCR6** che lega **CCL20** prodotta dai **macrofagi attivati da batteri e funghi** e vengono reclutati nell'intestino

**Patogenesi di malattie infiammatorie croniche ed autoimmuni:** malattie infiammatorie intestinali, psoriasi, artrite reumatoide e sclerosi multipla

# Differenziamento delle cellule T regolatorie (Treg)



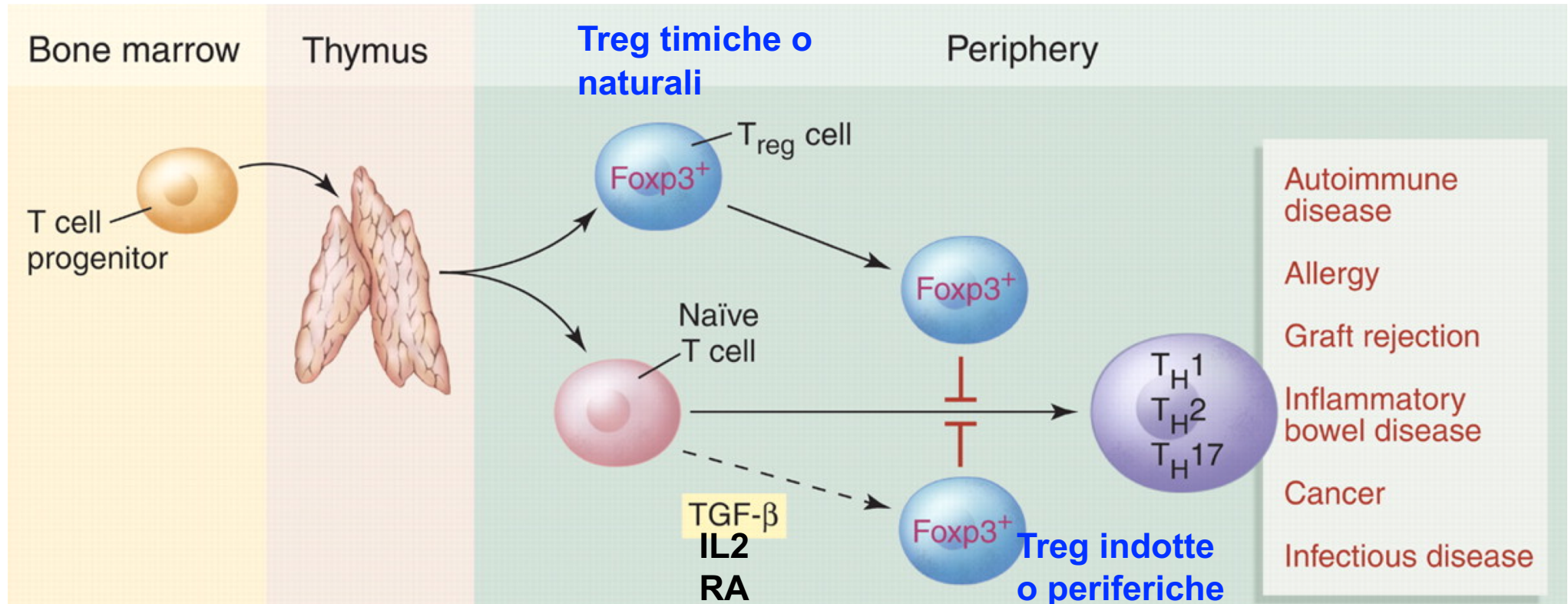
# Le cellule Treg naturali (o timiche) e la tolleranza periferica



**FOXP3:** Marcatore T<sub>reg</sub> fattore linea specifico (master regulator)

**IPEX** (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) Sindrome autoimmune sistemica causata da mutazioni di FOXP3 il cui gene mappa sul cromosoma X.

# Origine e differenziazione delle cellule Treg



- I linfociti T reg possono originare dal timo (**Treg naturali**) e sono linfociti T  $\text{CD4}^+$   $\text{CD25}^+$   $\text{FOXP3}^+$  che riconoscono Ag self o generarsi in periferia negli organi linfoidi secondari (**Treg indotte**) da linfociti T  $\text{CD4}^+$  in particolari condizioni immunomodulatorie e di presentazione subottimale dell'antigene.

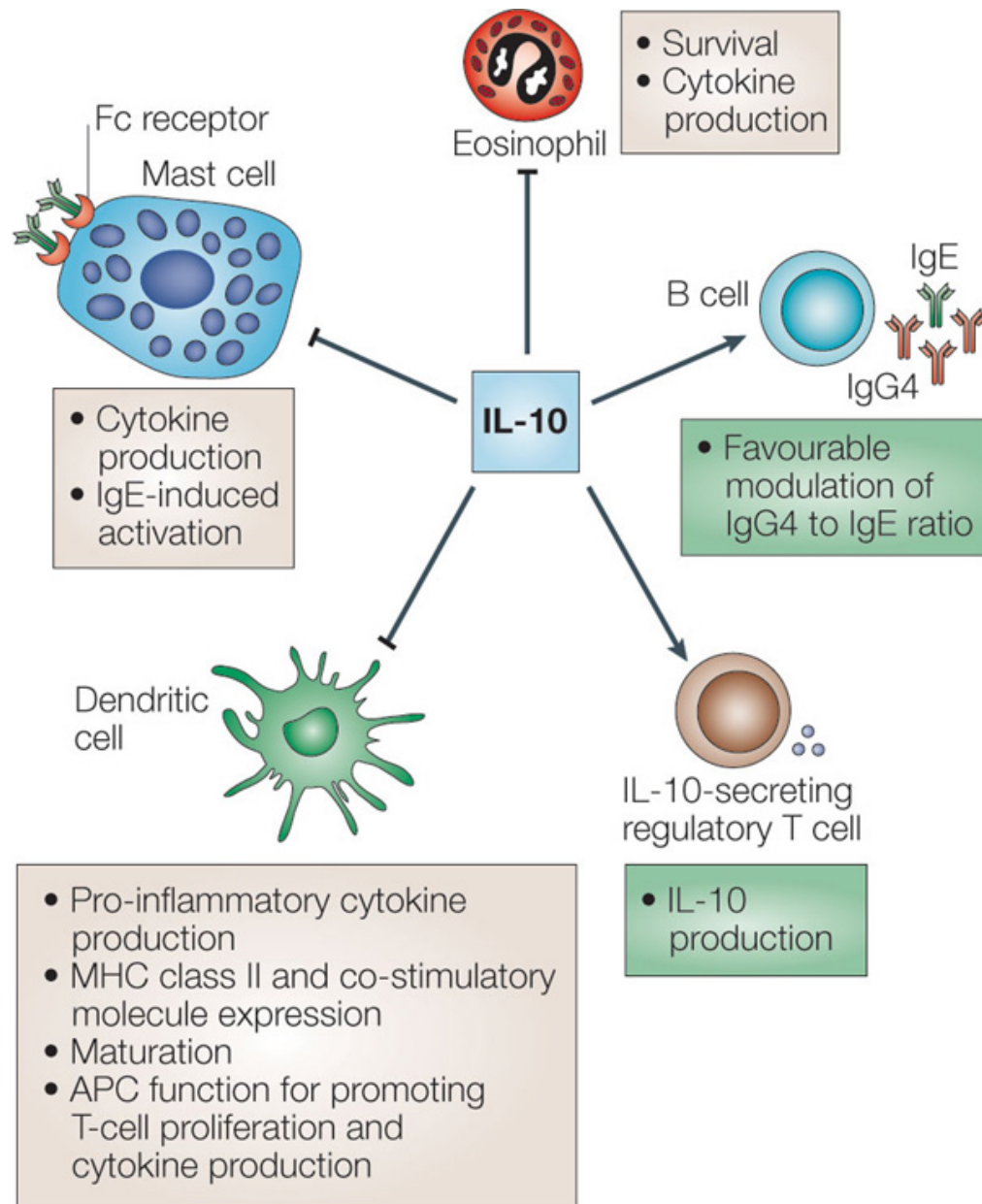
**-TGF $\beta$**  ed **IL-2** sono responsabili della loro generazione. **TGF- $\beta$**  e **IL-2** cooperano per indurre la trascrizione di **FOXP3** che è il master regulator dei Treg.

-Le cellule Treg sopprimono le risposte linfocitarie e l'attivazione di cellule dell'immunità innata attraverso la produzione di **TGF- $\beta$**  e **di IL10** e mediante altri meccanismi

## **Attività biologiche del TGF- $\beta$ : citochina immunosoppressiva**

- Inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei linfociti Th1 e Th2
- Inibisce l'attivazione dei macrofagi, neutrofili e cellule endoteliali
- Induce il differenziamento e la proliferazione dei Treg
- In associazione a IL-6 o IL-1 promuove lo sviluppo dei linfociti Th17
- Induce lo switch dell'isotipo verso le IgA (immunità mucosale)
- Favorisce i processi di riparazione tissutale in seguito a danno; infatti stimola i macrofagi ed i fibroblasti a sintetizzare collagene ed enzimi per il rimodellamento tissutale
- Favorisce l'angiogenesi

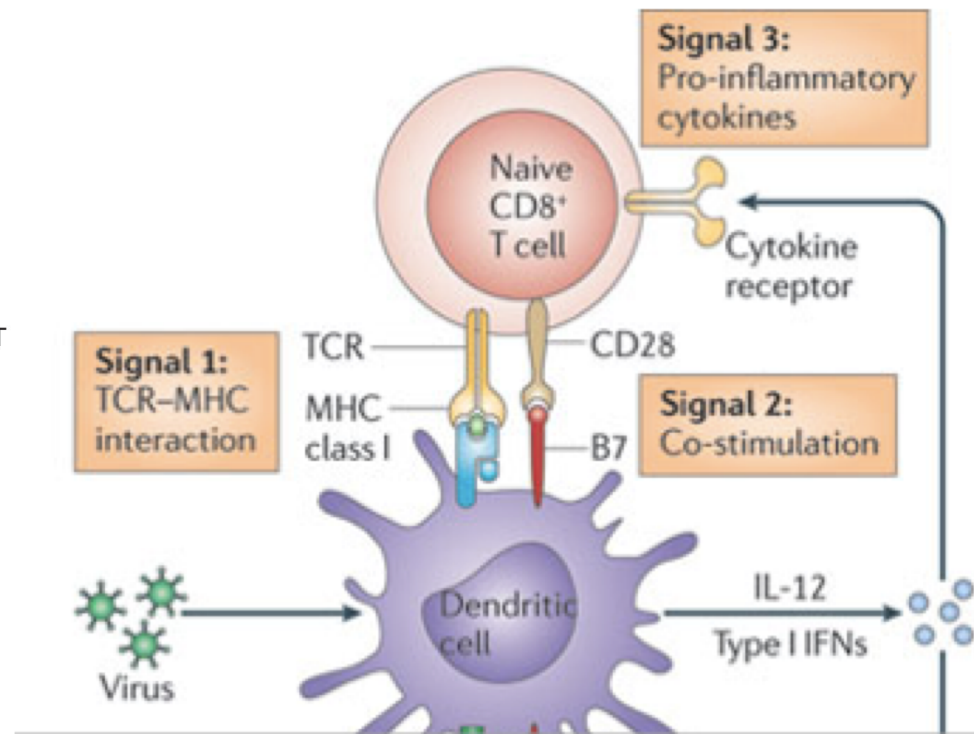
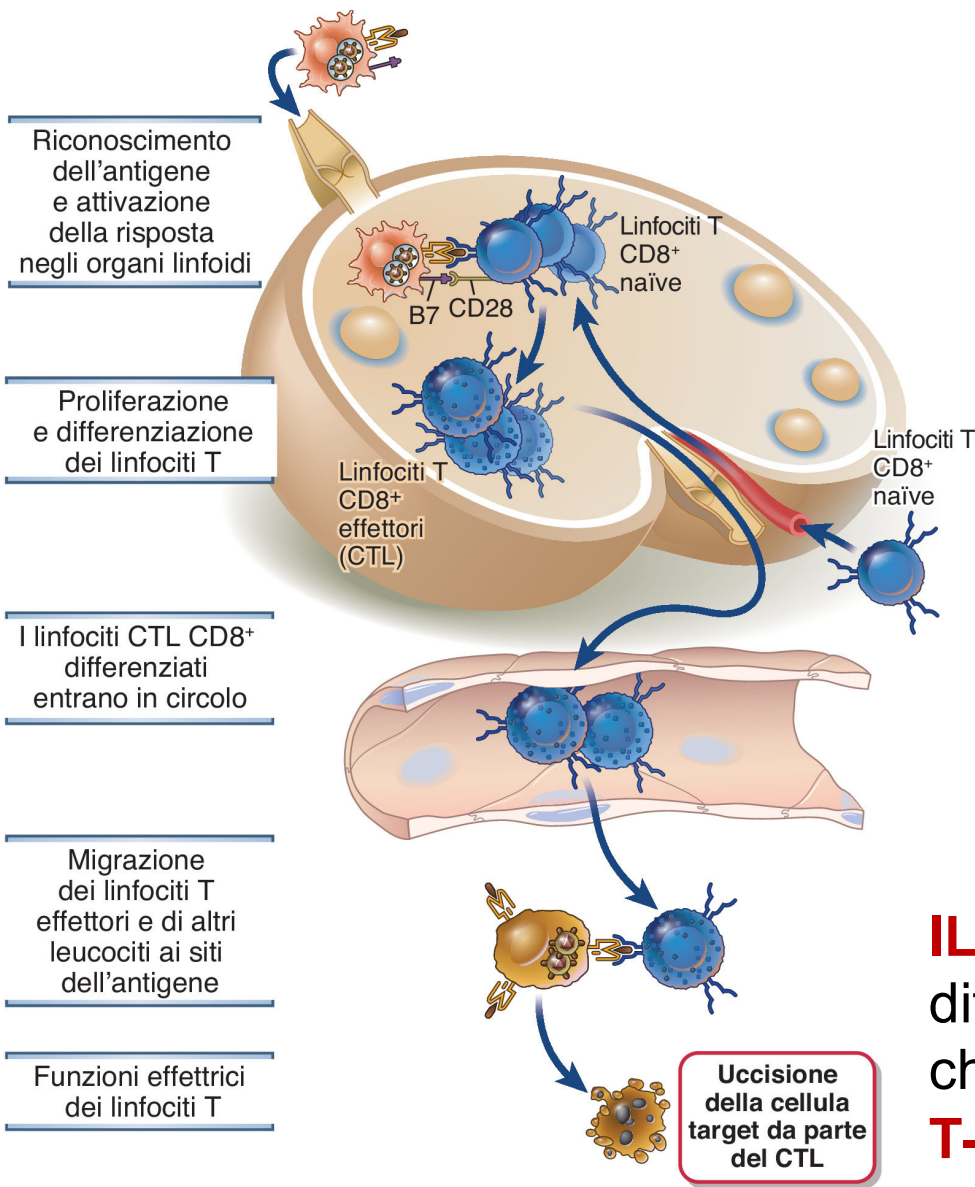
# IL-10: citochina con funzioni immunosoppressive



- **Inibizione produzione IL-12:** Agisce soprattutto sui macrofagi attivati e cellule dendritiche inibendo la produzione di IL-12 e quindi **inibisce il differenziamento Th1** e la produzione di IFN- $\gamma$
- **Inibizione espressione molecole costimolatorie e delle molecole MHC-II:** inibizione attivazione linfociti T CD4<sup>+</sup>



# Differenziamento linfociti T CD8<sup>+</sup>



**IL-12 e IFN di tipo I** promuovono il differenziamento dei CD8<sup>+</sup> citotossici: che esprimono come master regulators **T-bet** e **eomesodermina**

# Attività citotossica dei linfociti T CD8+

## Lisi della cellula bersaglio

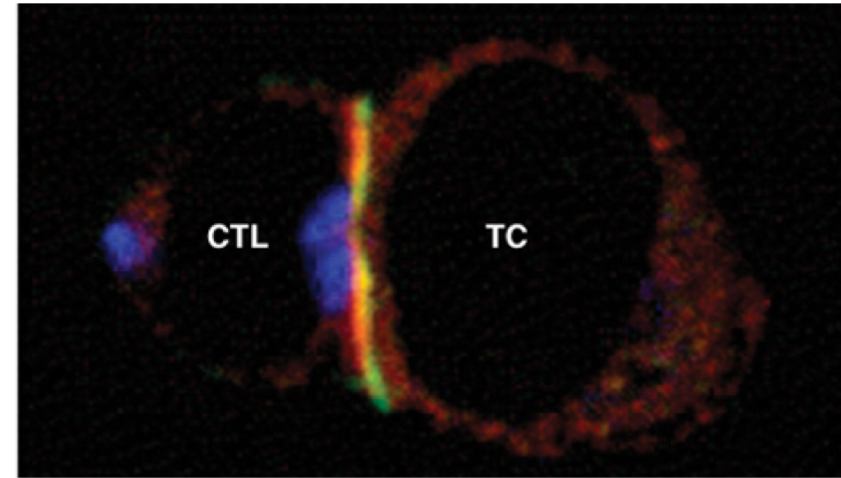
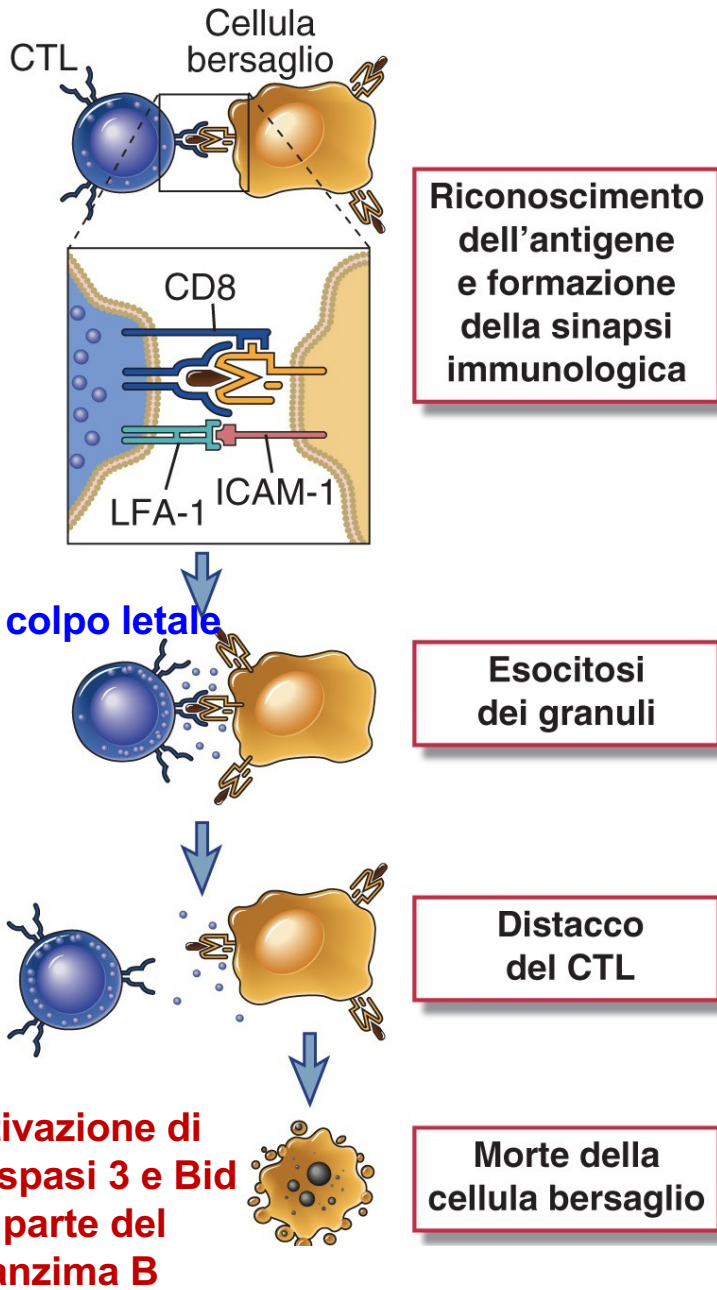


Immagine di microscopia confocale di una sinapsi immunologica tra CTL e cellula target (TC) :  
In blu la catepsina B contenuta in un granulo secretorio; In verde LFA1; in rosso la talina

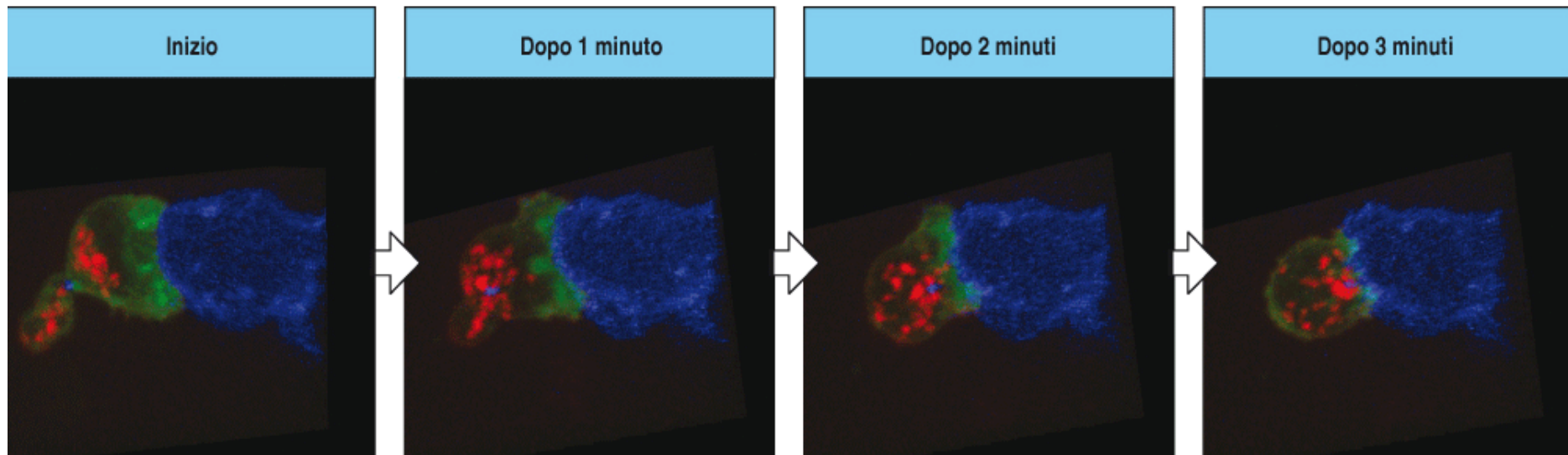
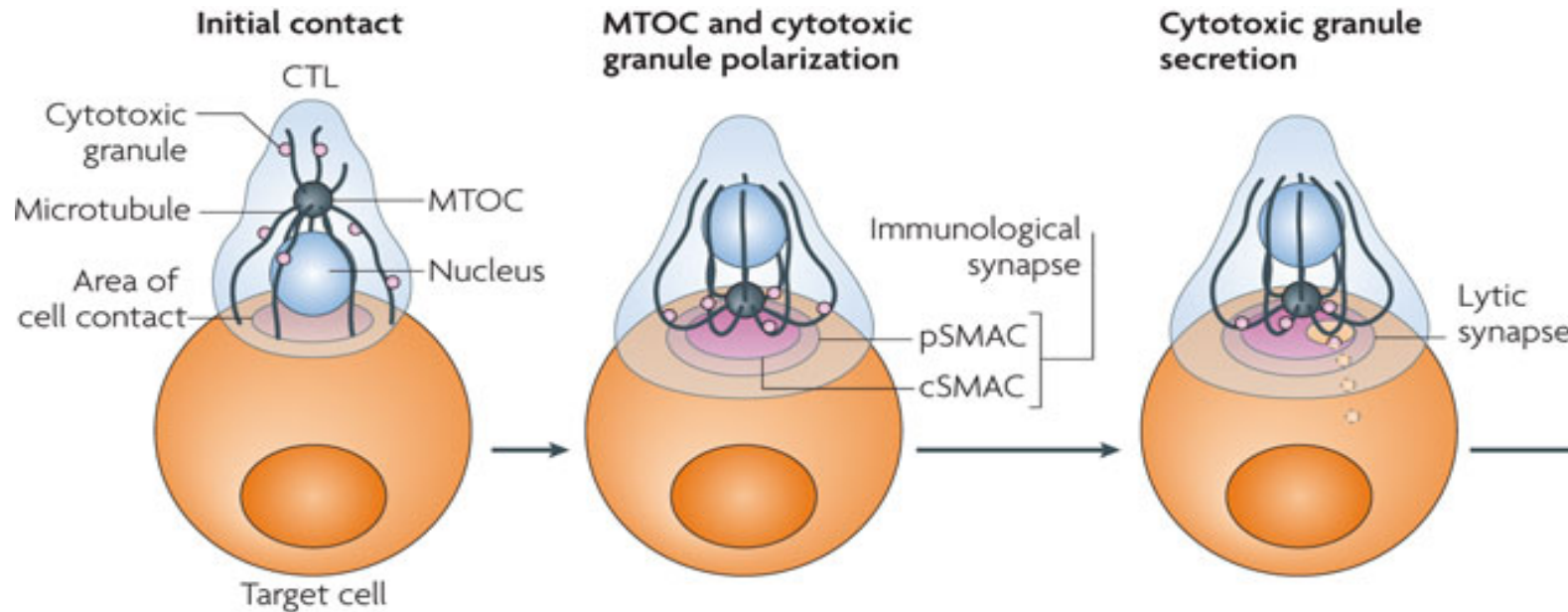
## I Granuli contengono:

**Granzimi A, B e C:** serin-proteasi che tagliano le proteine dopo un residuo di acido aspartico

**Perforine:** molecola omologa alla componente C9 del complemento che altera la struttura della membrana

**Serglicina:** proteoglicano solfato che assembla i complessi perforina/granzimi

# Formazione della sinapsi immunologica e lisi della cellula bersaglio

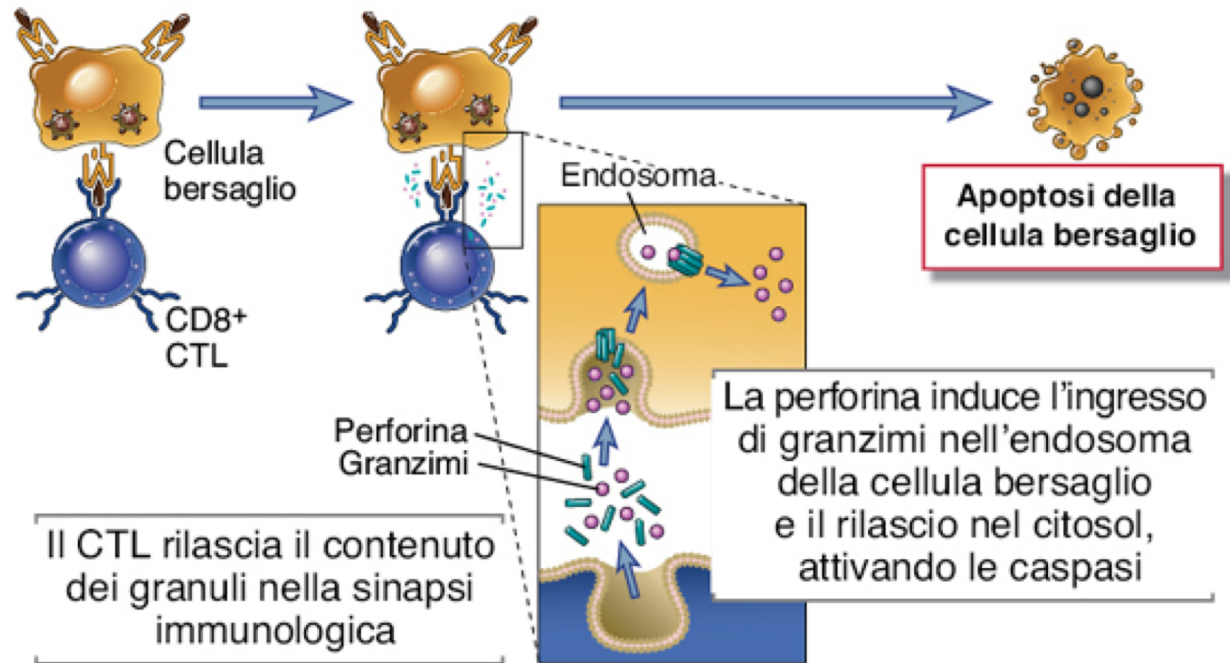


■ Cellula bersaglio ■ perforine ■ actina

# Meccanismi di citotossicità

I CTL possono uccidere la cellula bersaglio mediante due meccanismi distinti

## 1. meccanismo mediato da perforina/granzima B



## 2. meccanismo mediato da Fas/FasL

