

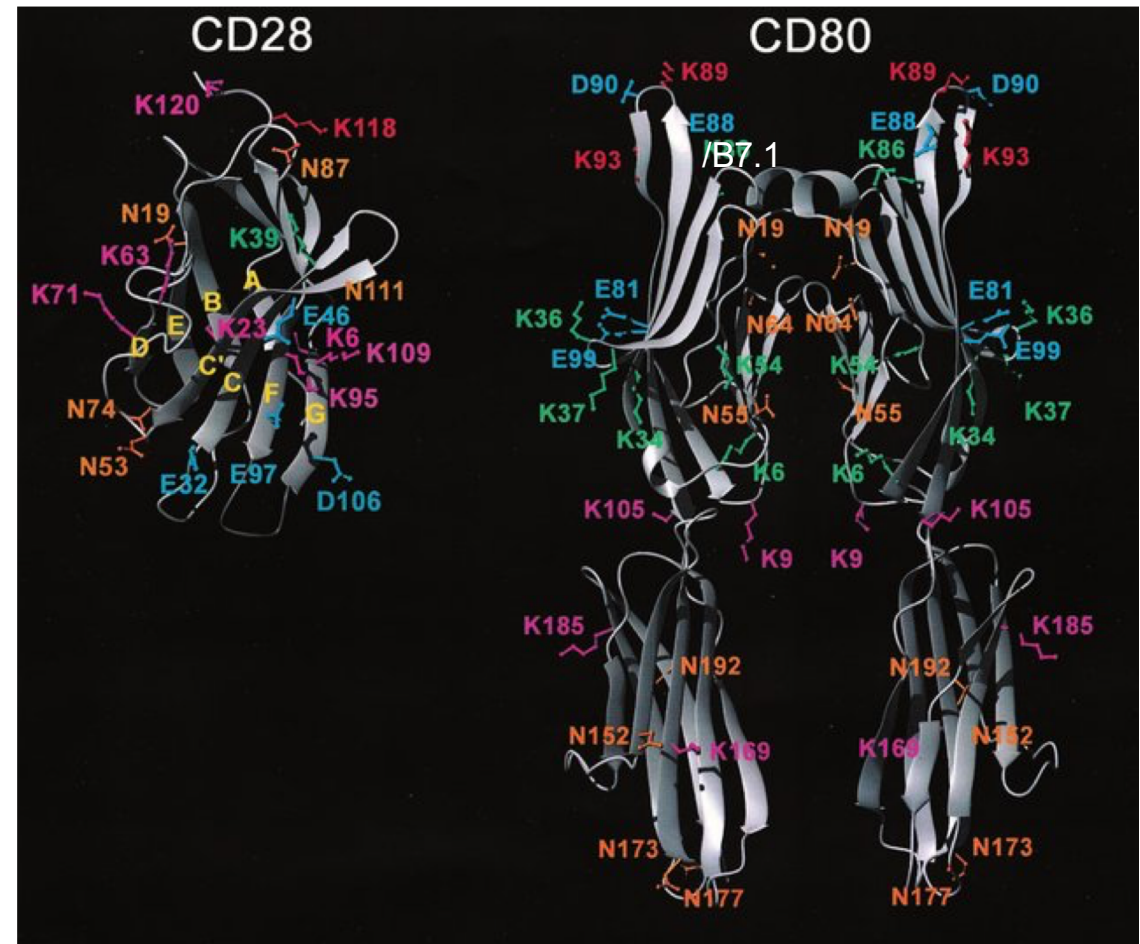
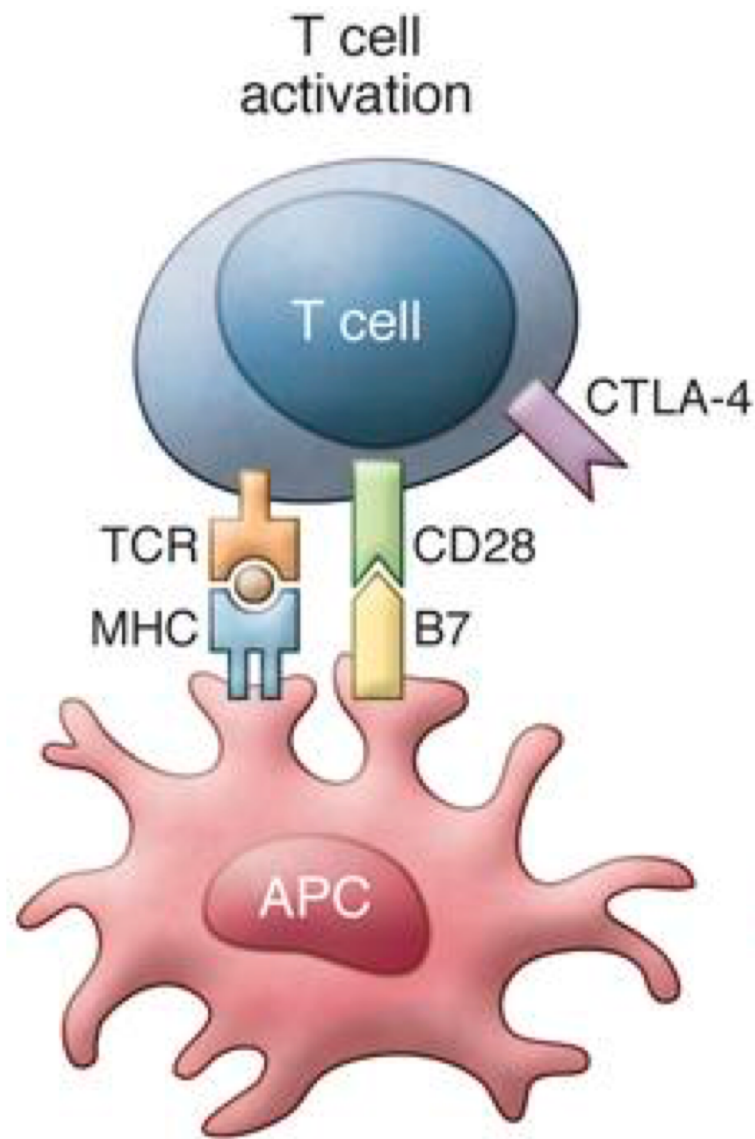
**Codice OPIS 2023-24**

**5BFX9D8**

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

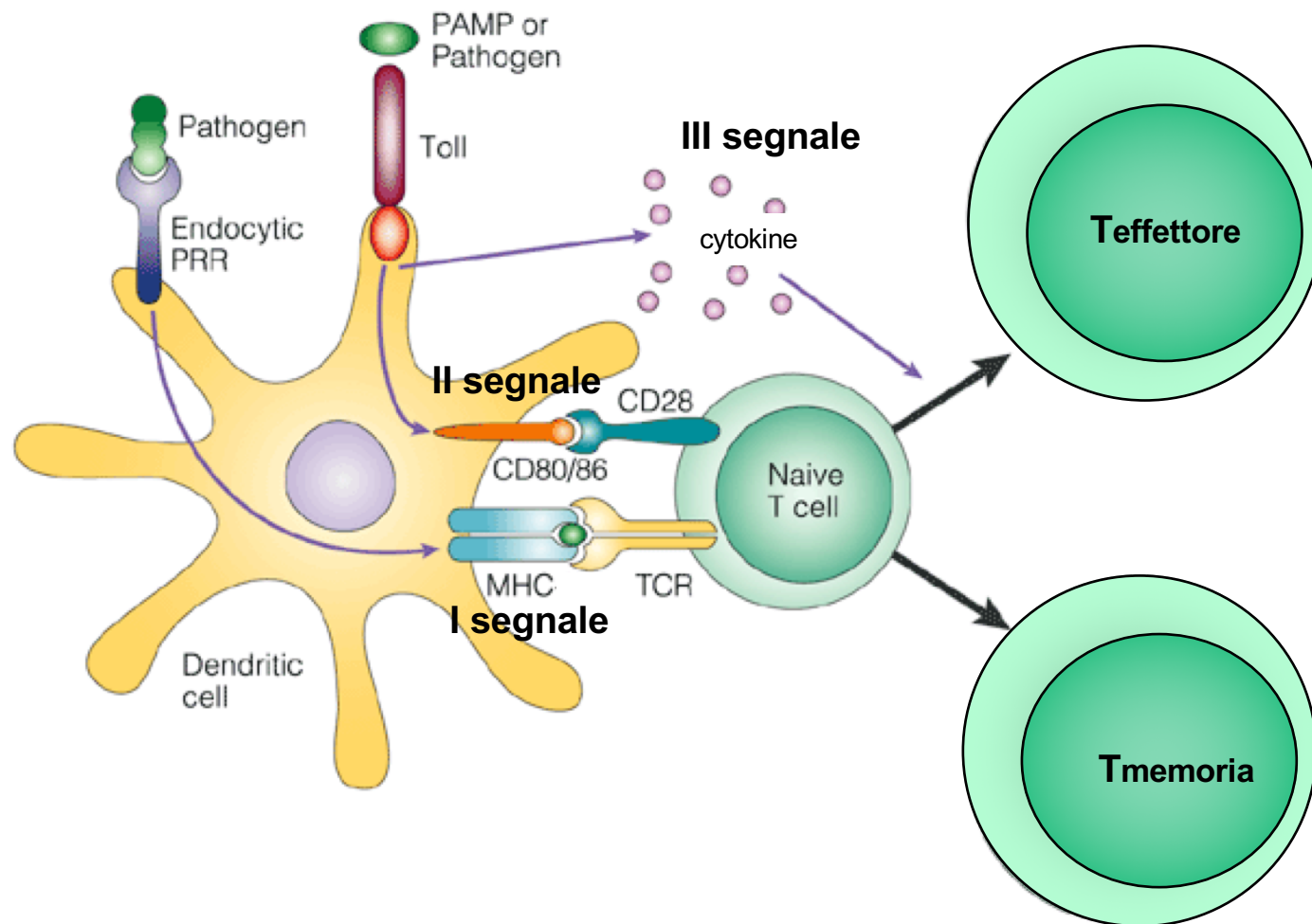
**SCIENZE BIOLOGICHE (30857)**

# Molecole e vie di costimolazione



# Riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T naive

Ruolo degli adiuvanti nei vaccini

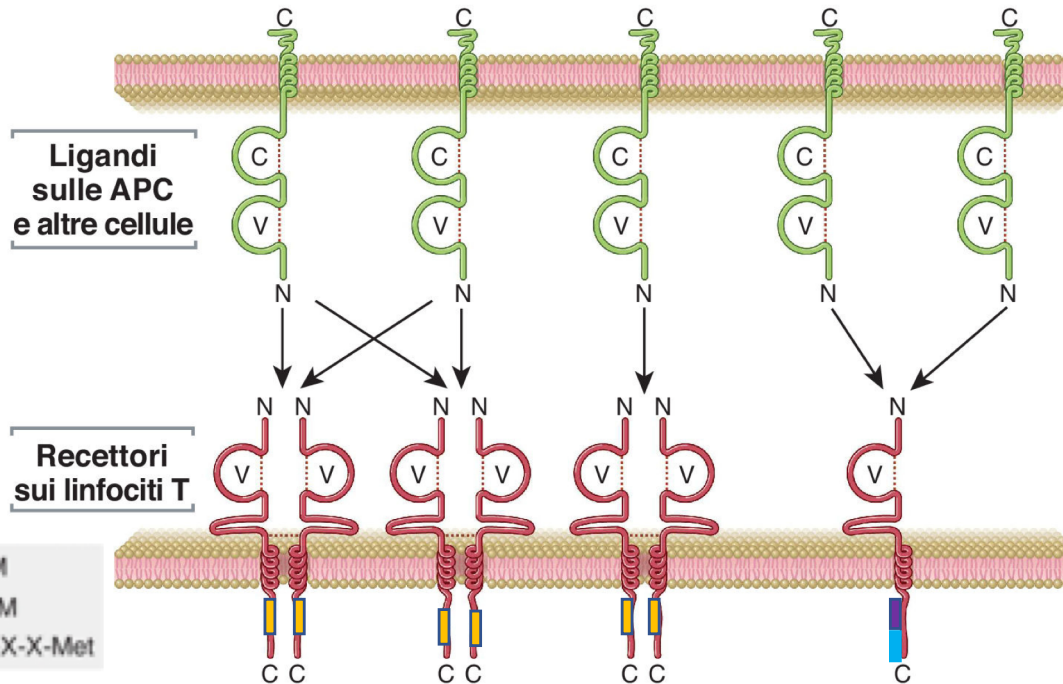


- Tre segnali servono ad un linfociti T naive per l'attivazione, proliferazione e differenziamento in linfocita T effettore e della memoria.
- L'assenza del secondo segnale (per mancata attivazione dell'immunità innata/inflammation) determina **anergia** (mancata responsività funzionale).

# Membrì 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)



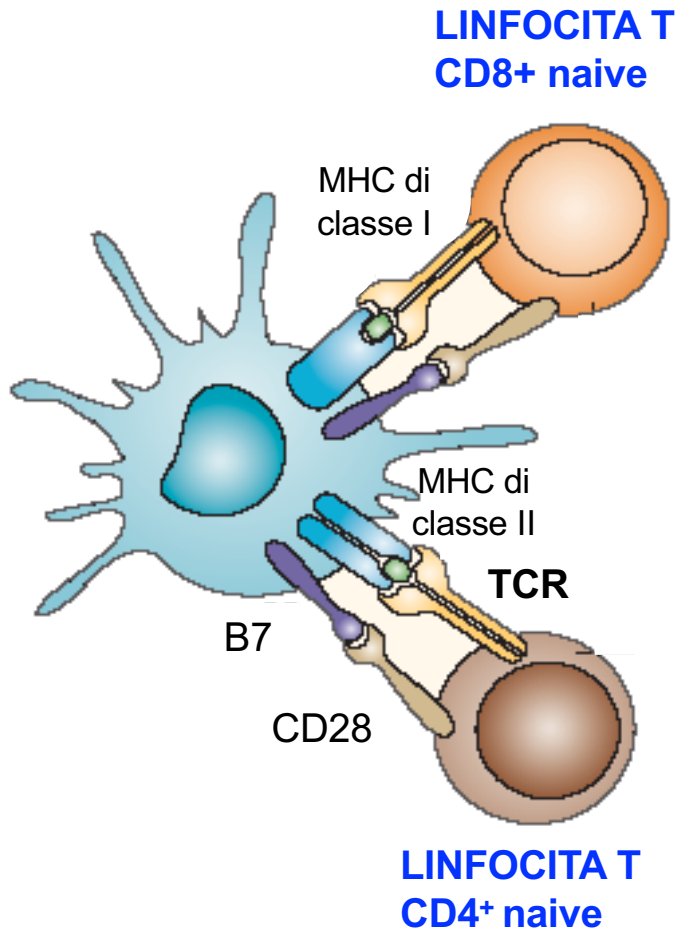
Nome	CD28	CTLA-4	ICOS	PD-1
Espressione sui linfociti T	Linfociti T naïve	Linfociti T regolatori e T linfociti attivati	Linfociti T attivati; linfociti T helper follicolari (T <sub>FH</sub> )	Linfociti T attivati
Funzione principale	Attivazione linfociti T naïve; attivazione della risposta immunitaria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

## Recettori Costimolatori/ (coinibitori)

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

## Membrì della famiglia CD28

# CD28 ed il modello dei “due segnali”



## Riconoscimento dell'antigene

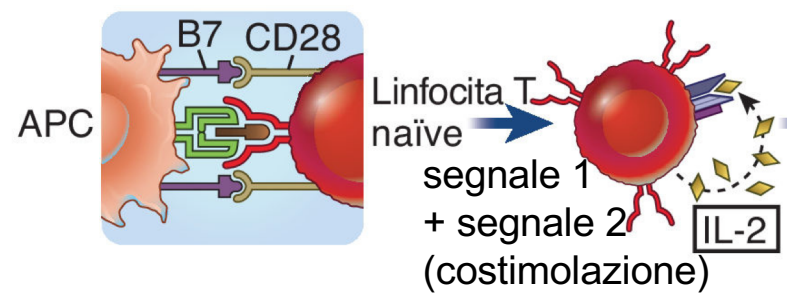
APC a riposo (che manca di molecole costimolatorie)



## Risposta T

**Nessuna risposta o tolleranza**  
**ANERGIA**

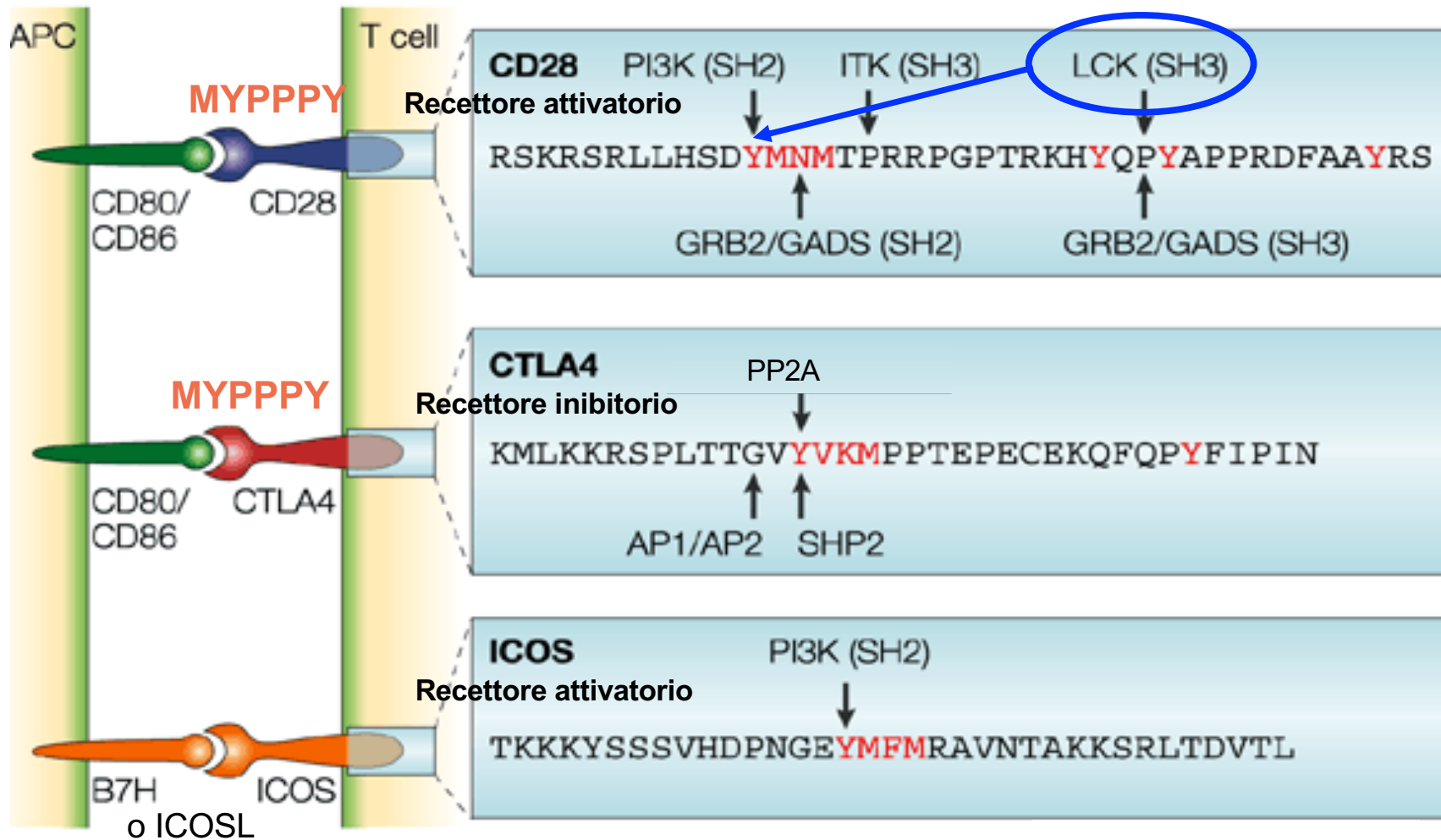
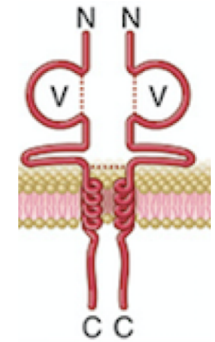
Microbi e risposte innate aumentano l'espressione delle molecole costimolatorie delle APC



Linfociti T effettori

**Sopravvivenza, proliferazione e differenziament dei linfociti T**

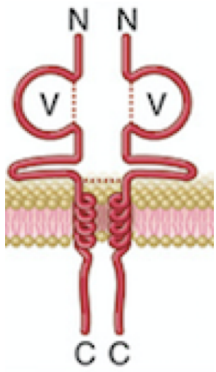
# Comparazione tra CD28, CTLA4 e ICOS



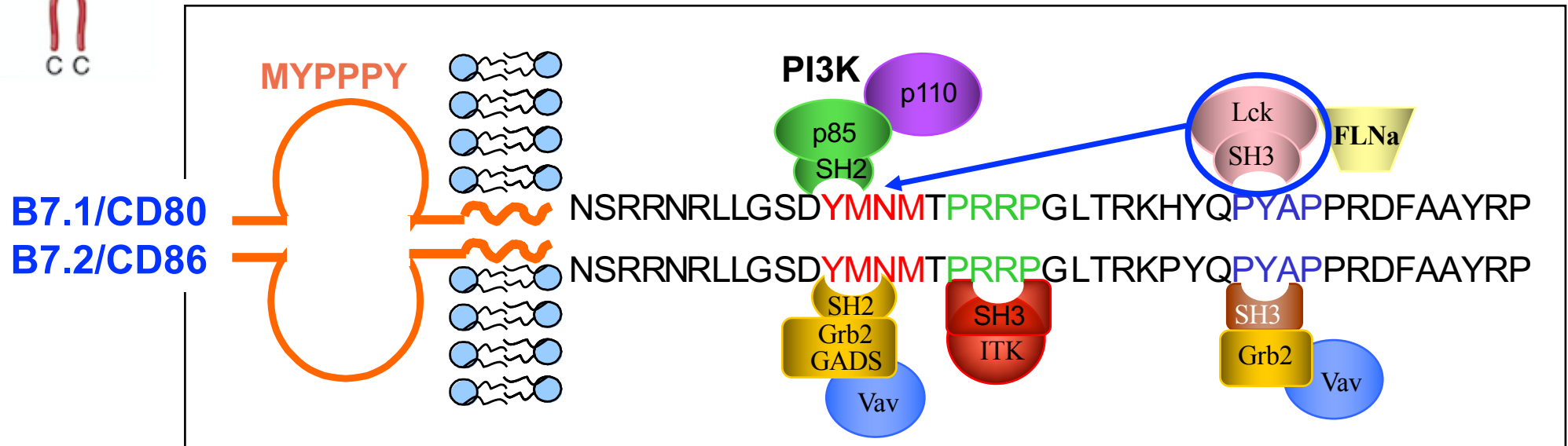
**Chr 2q33**

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 $\gamma$** , **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<sub>L</sub> 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 $\gamma$ , IL-4 etc)

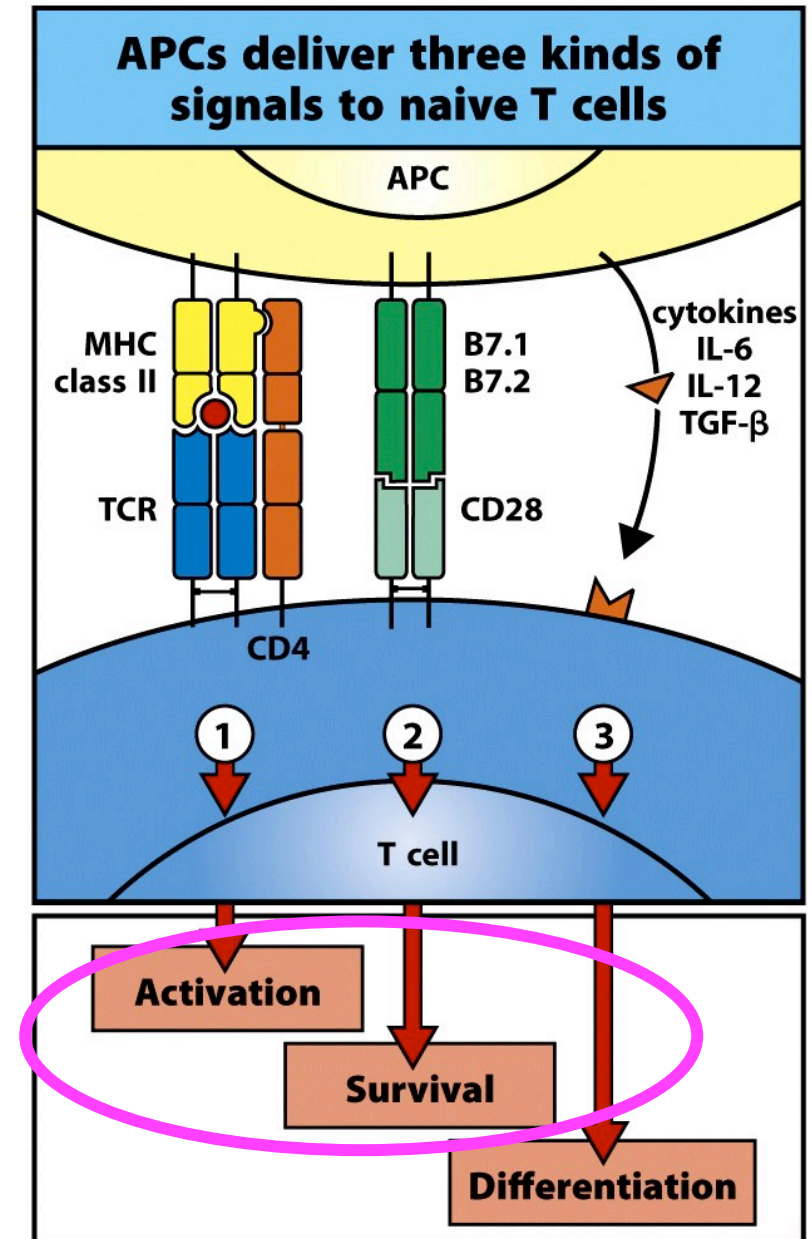
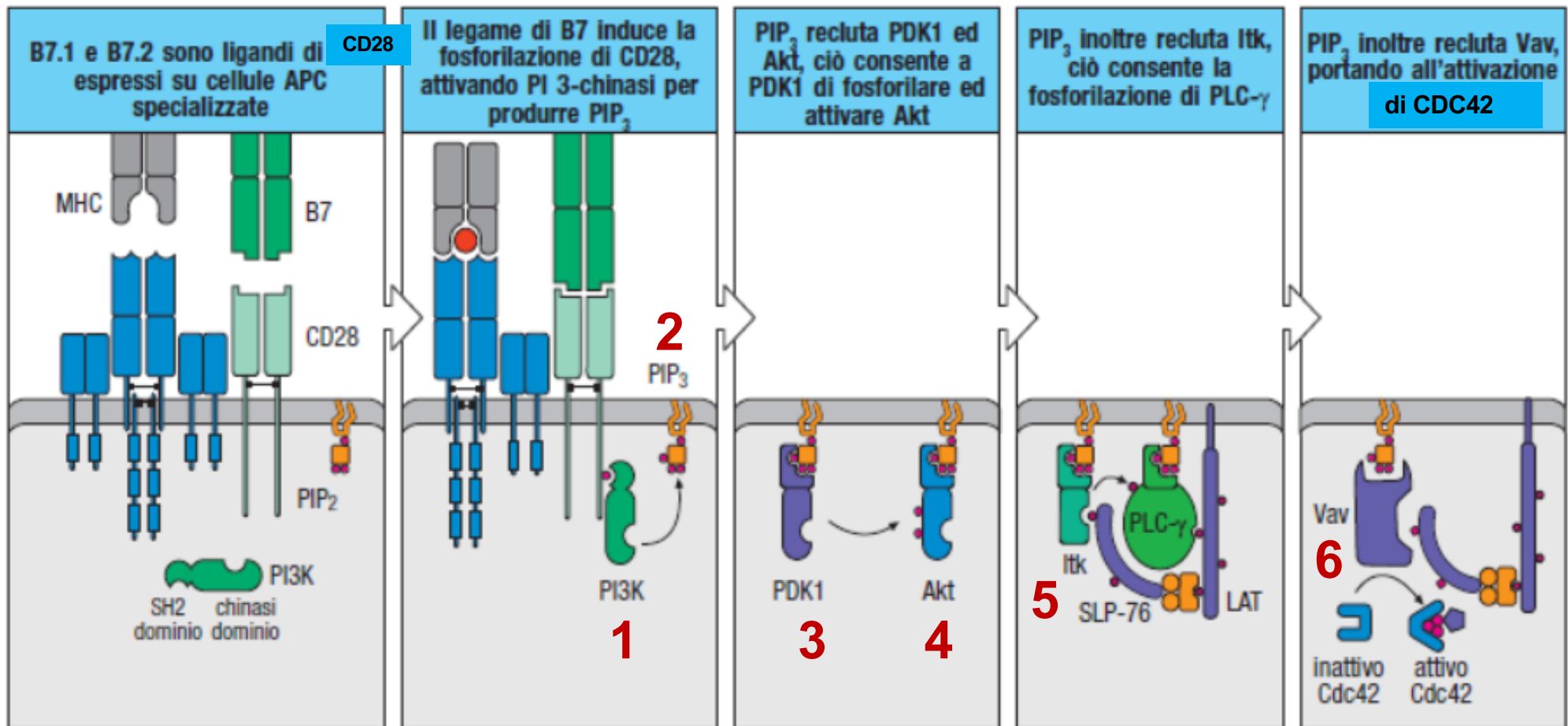


Figure 8-19 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

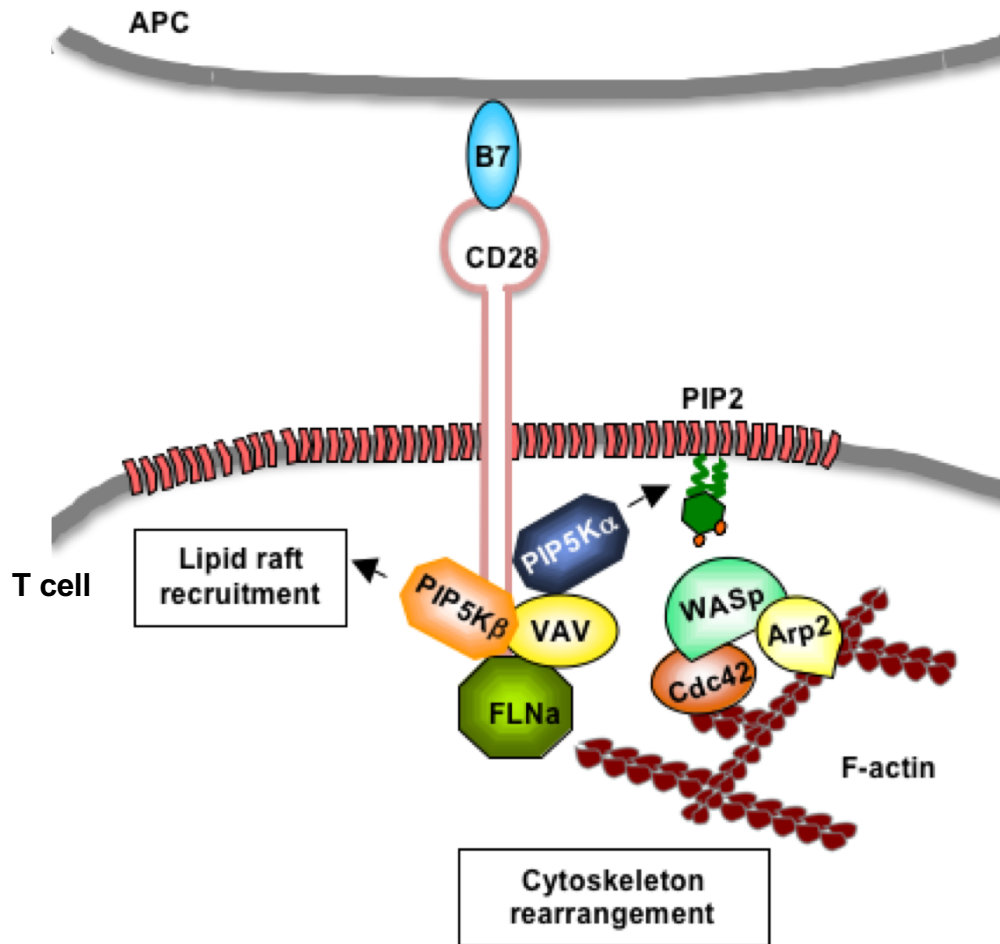


## CD28 trasduce segnali che potenziano le vie di trasduzione del segnale indotte via TCR



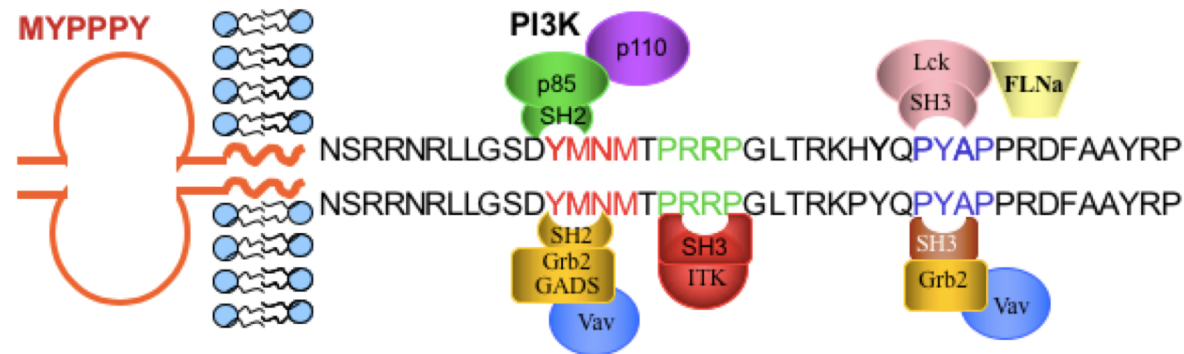
I ligandi di CD28 ovvero CD80 e CD86 sono espressi solo su cellule specializzate presentanti l'antigene. L'impegno di CD28 induce la sua fosforilazione in tirosina che attiva la **(1) PI3K** con successiva produzione di **(2) PIP3** da PIP<sub>2</sub> che recluta diversi enzimi tramite il loro dominio PH portandoli insieme ai loro substrati nella membrana. PIP<sub>3</sub> recluta la proteina chinasi-fosfoinositide dipendente **(PDK1) (3)** che fosforila la protein chinasi **Akt (4)** che 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**. PIP<sub>3</sub> recluta anche **VAV (6)** portando all'attivazione di CDC42 e inducendo polimerizzazione dell'actina.

# CD28 e riarrangiamento del citoscheletro

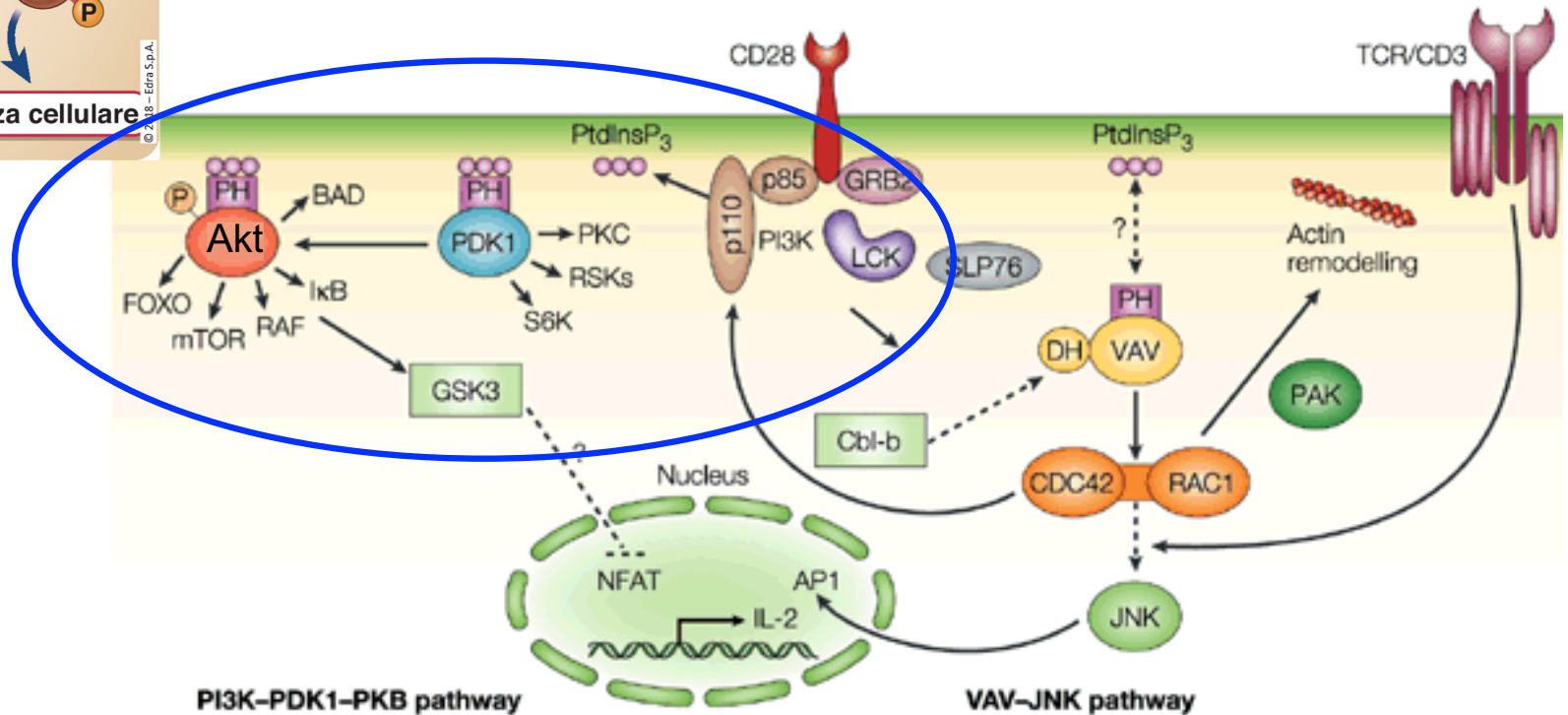
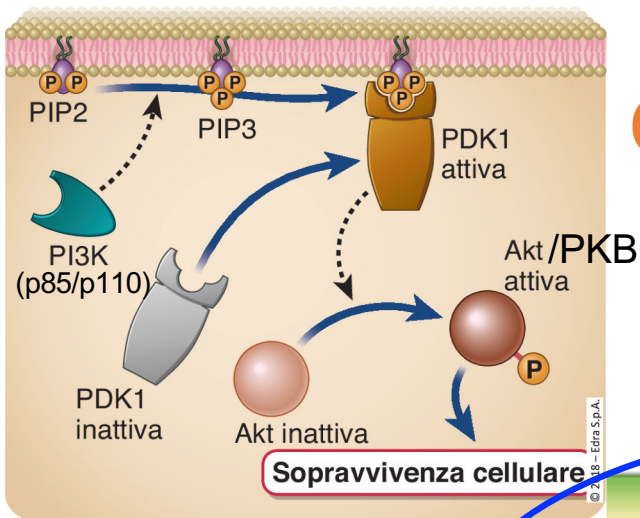


- Dopo interazione con B7, CD28 si lega a **Vav1** (probabilmente attraverso Grb2 e pYMMN) e si associa a **PIP5K**.
- **PIP5K** genera PIP2 che favorisce il **reclutamento di WASP**.
- Vav1 attiva Cdc42 che lega WASP che una volta attivato lega Arp2/3 inducendo così la polimerizzazione e la riorganizzazione 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 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.

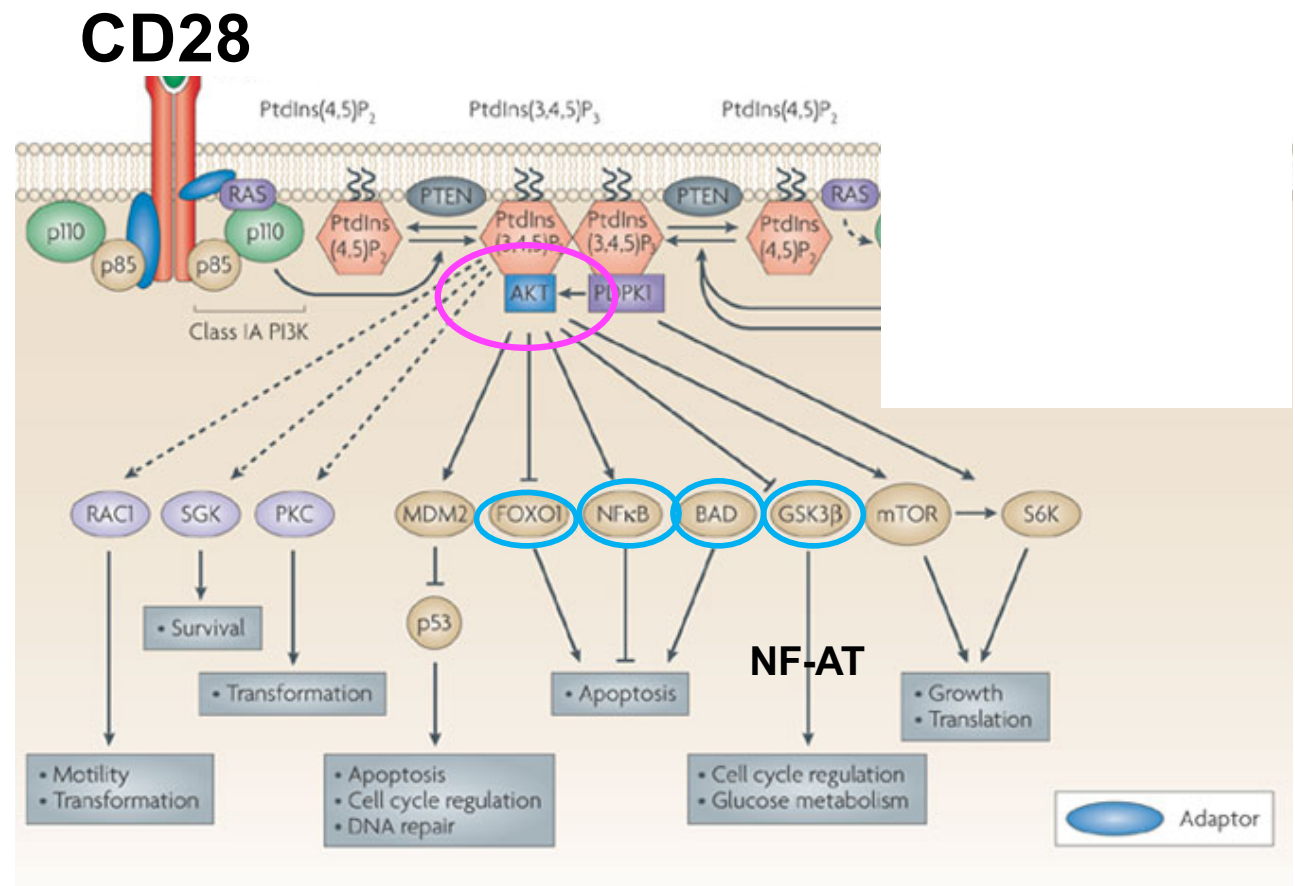
A PIP3 si legano PDK1 e Akt(PKB) → attivazione della via di segnalazione di Akt e mTOR.

# 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 $\beta$  e residuo 21 per GSK3 $\alpha$ ), e la inattiva permettendo che NF-AT sia presente nel nucleo e migliorando la trascrizione dei geni bersaglio.

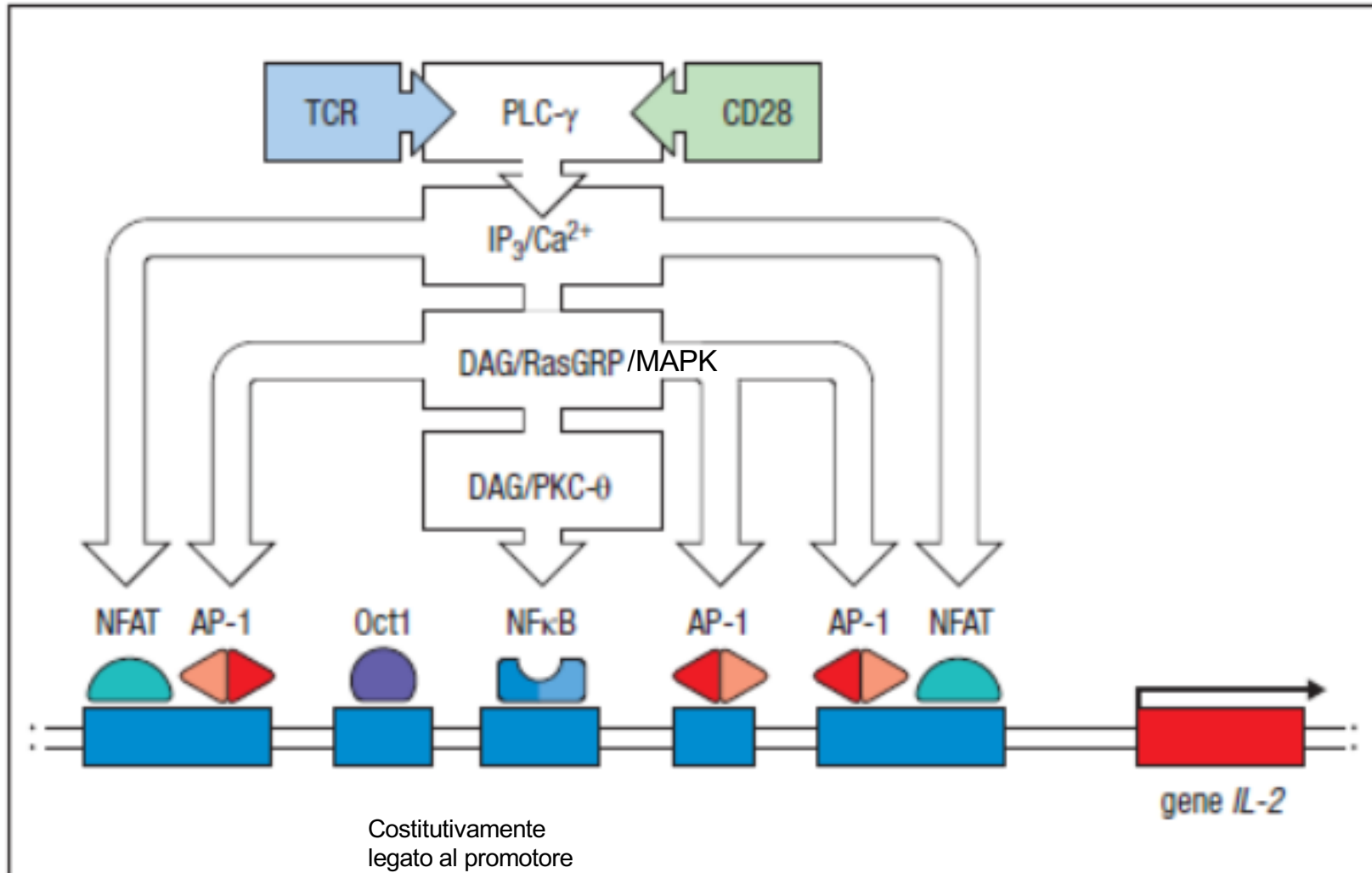
**2. Akt regola il metabolismo cellulare.** La transizione da una cellula T a riposo a una cellula T effettrice richiede un **aumento della glicolisi** per fornire energia e per l'attivazione. Akt fosforila diversi enzimi della via glicolitica e ne potenzia l'attività. Inoltre mTORC1 migliora la glicolisi.

**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.



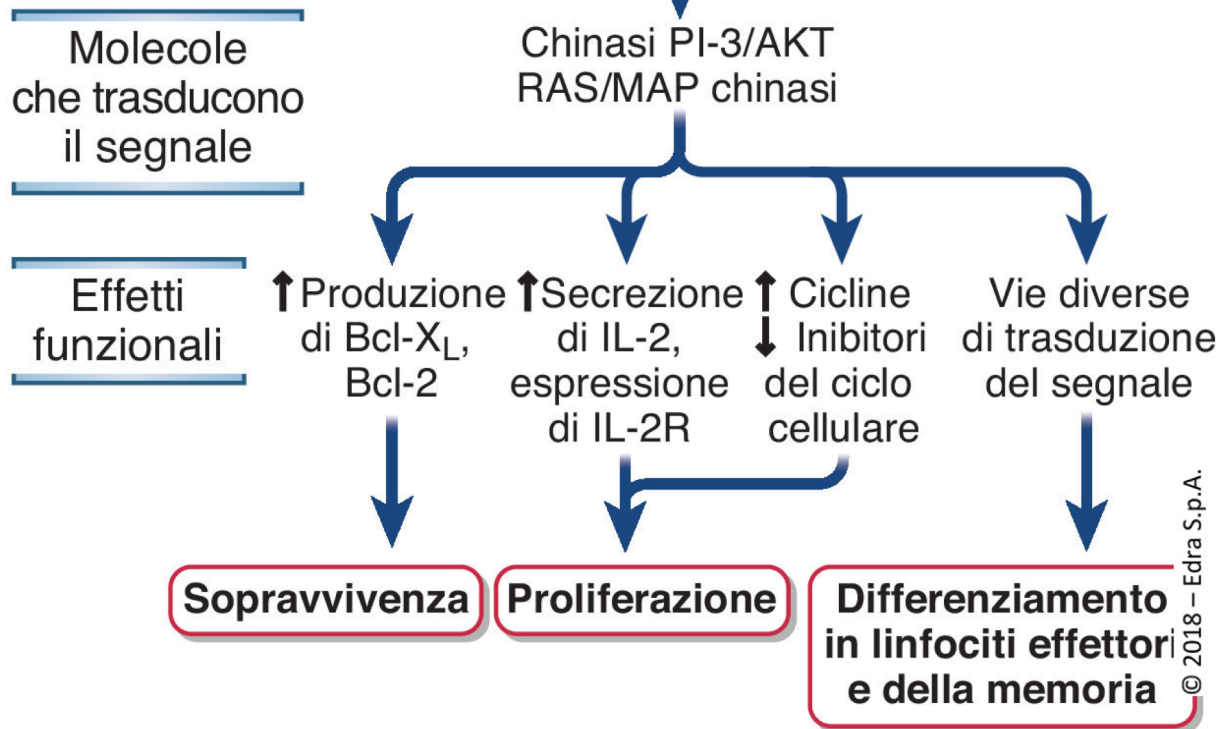
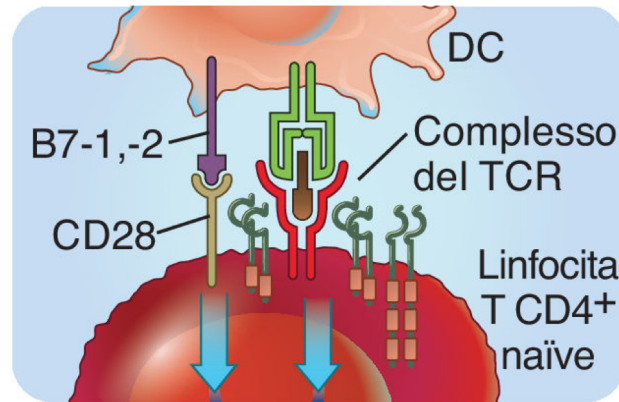
**4. Akt favorisce l'attivazione di NF- $\kappa$ B**

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

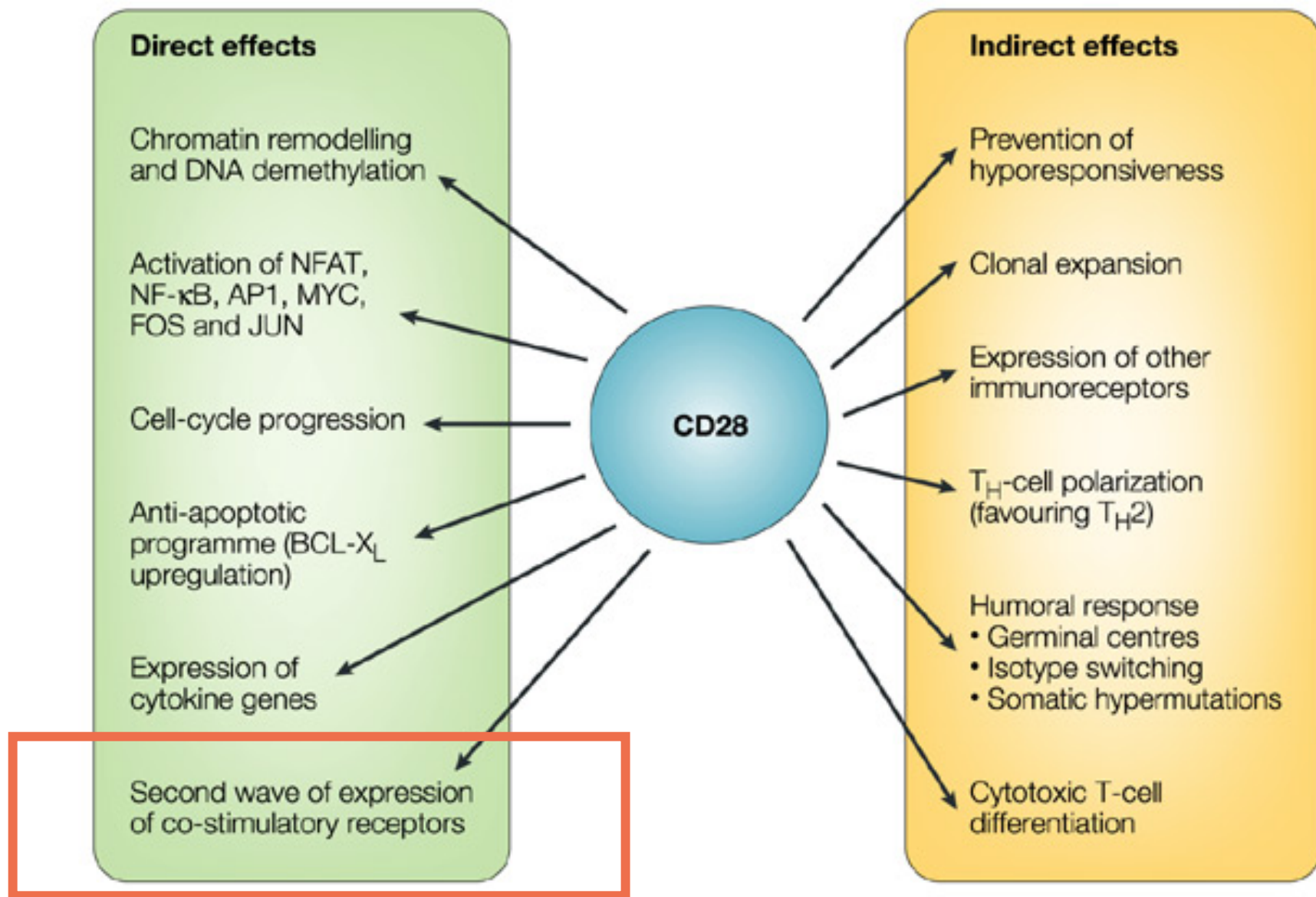


**Potenziamento di NF-AT, NF $\kappa$ B, AP1 e MAPK**  
(espressione di IL-2 e CD25, IFN- $\gamma$ , IL-4, altro)

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

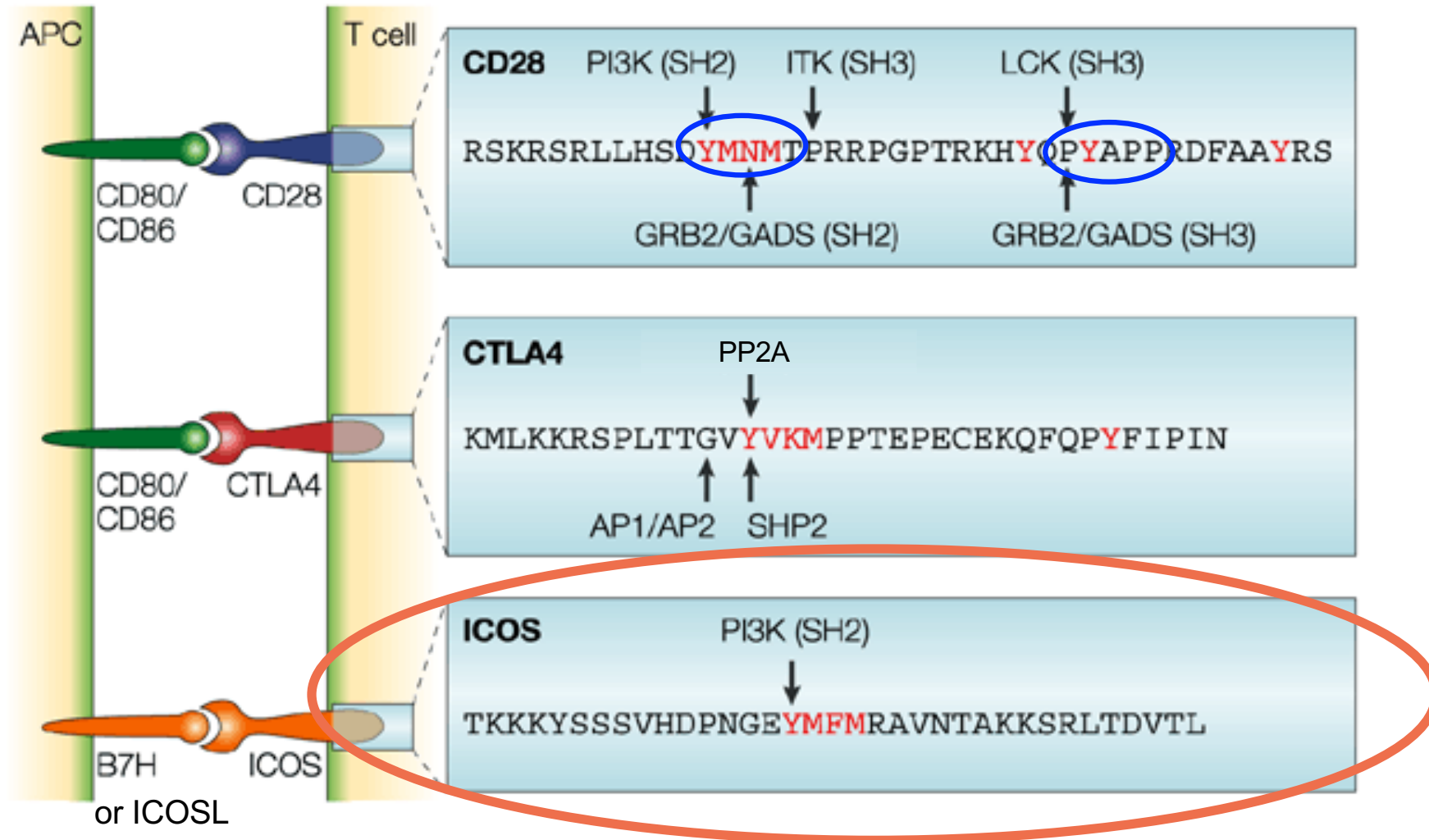


- Aumento dell'espressione delle proteine anti-apoptotiche
- Aumento della produzione di citochine e dell'espressione dei recettori per citochine
- Stimolazione della proliferazione cellulare
- Attivazione del differenziamento cellulare



**ICOS, CTLA4 e PD-1**

# Recettore costimolatorio ICOS (Inducible T-cell COStimulator)



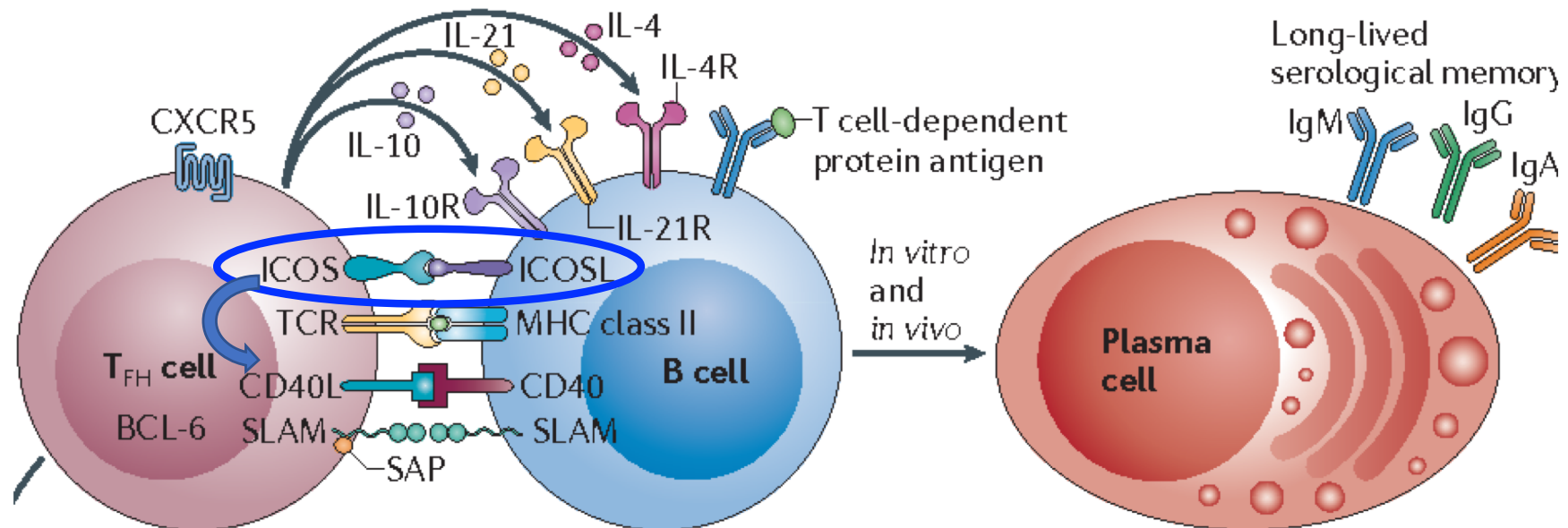
CD28 possiede il motivo **YMNM**

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

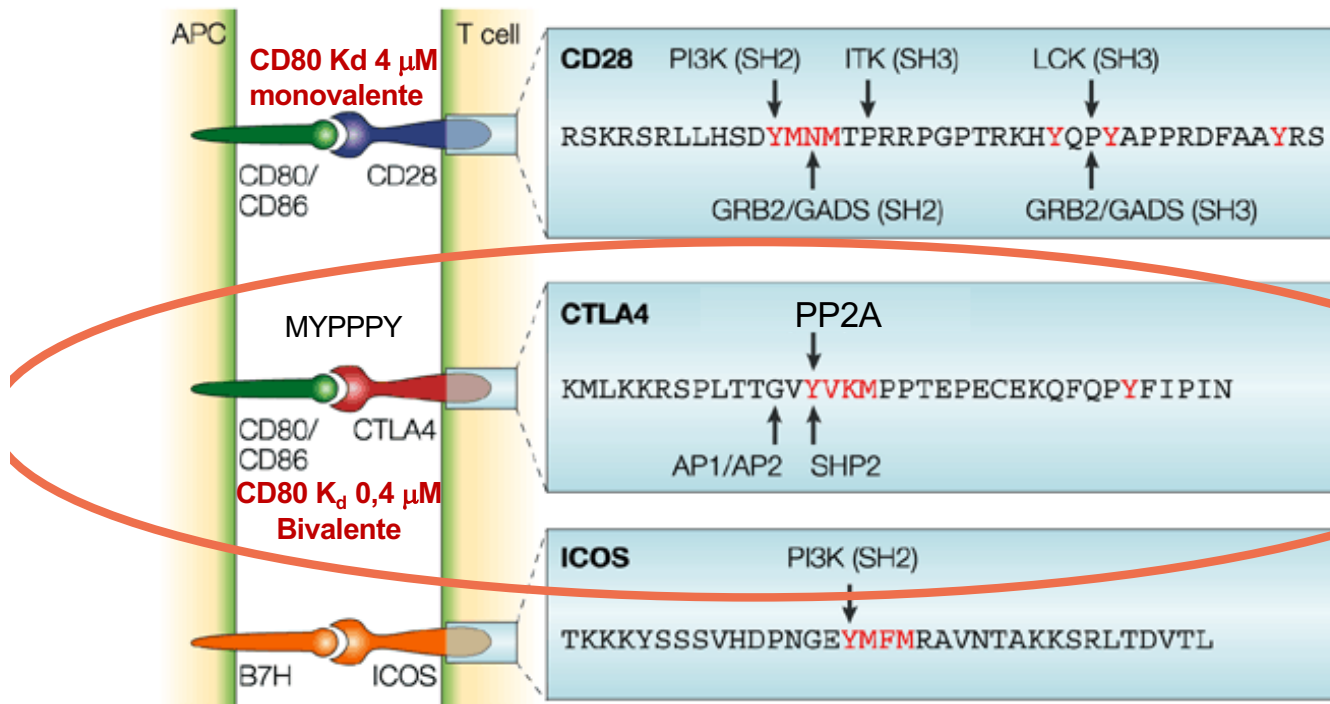


# Effetti della co-stimolazione da parte di ICOS

- Espresso solo su linfociti T attivati
- Come il CD28 attiva la PI3K/AKT (grazie al motivo **YMFM**) ma non attiva MAPK, NF- $\kappa$ 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



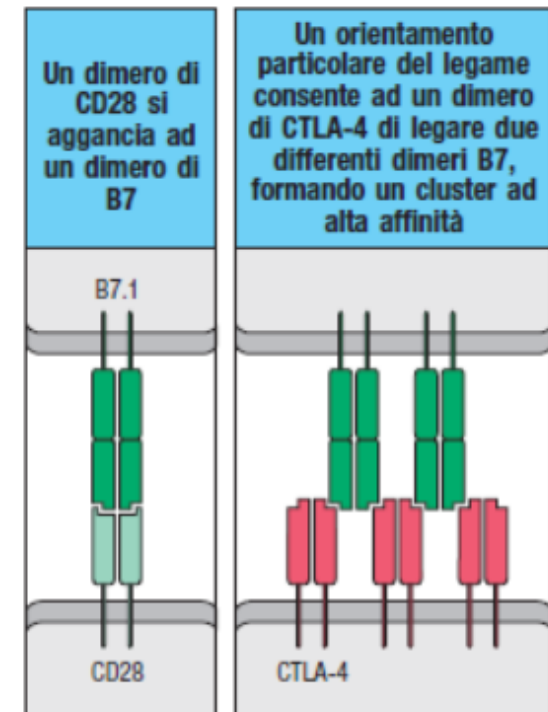
**PP2A:** Ser/Thr fosfatasi

**SHP2:** Tirosin fosfatasi

CTLA4 = Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

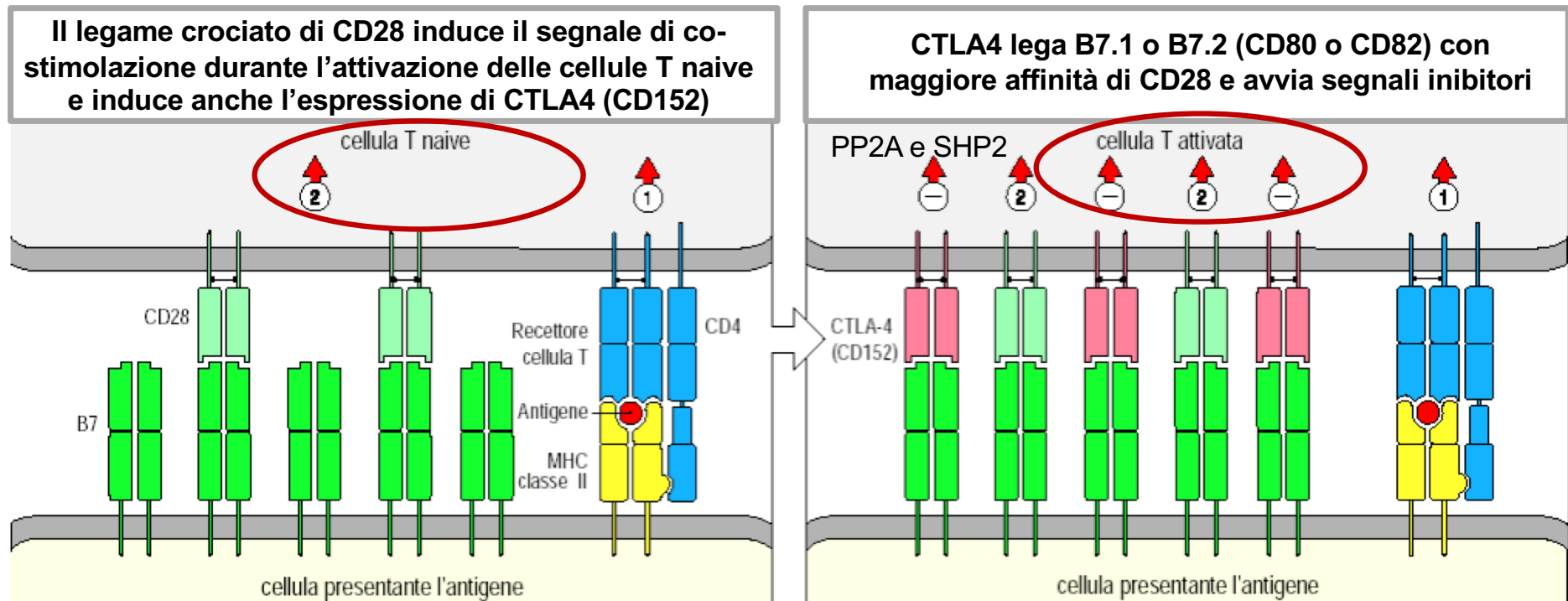
Nature Reviews | Immunology

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



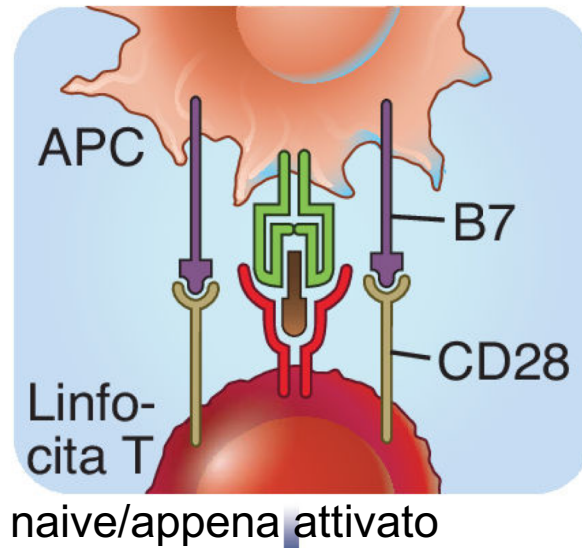
# CTLA4 (coinibitore) è espresso dai linfociti T attivati da TCR/CD28

ed ha un effetto opposto a quello di CD28

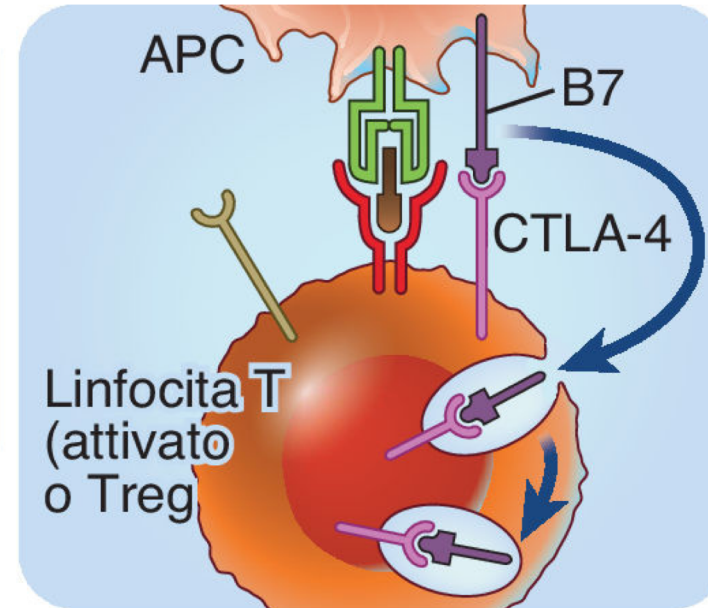


L'espressione a livello proteico di CTLA-4 è rilevabile sulla superficie dei linfociti T 24-48 ore dopo attivazione.

## Effetti funzionali del recettore inibitorio CTLA4

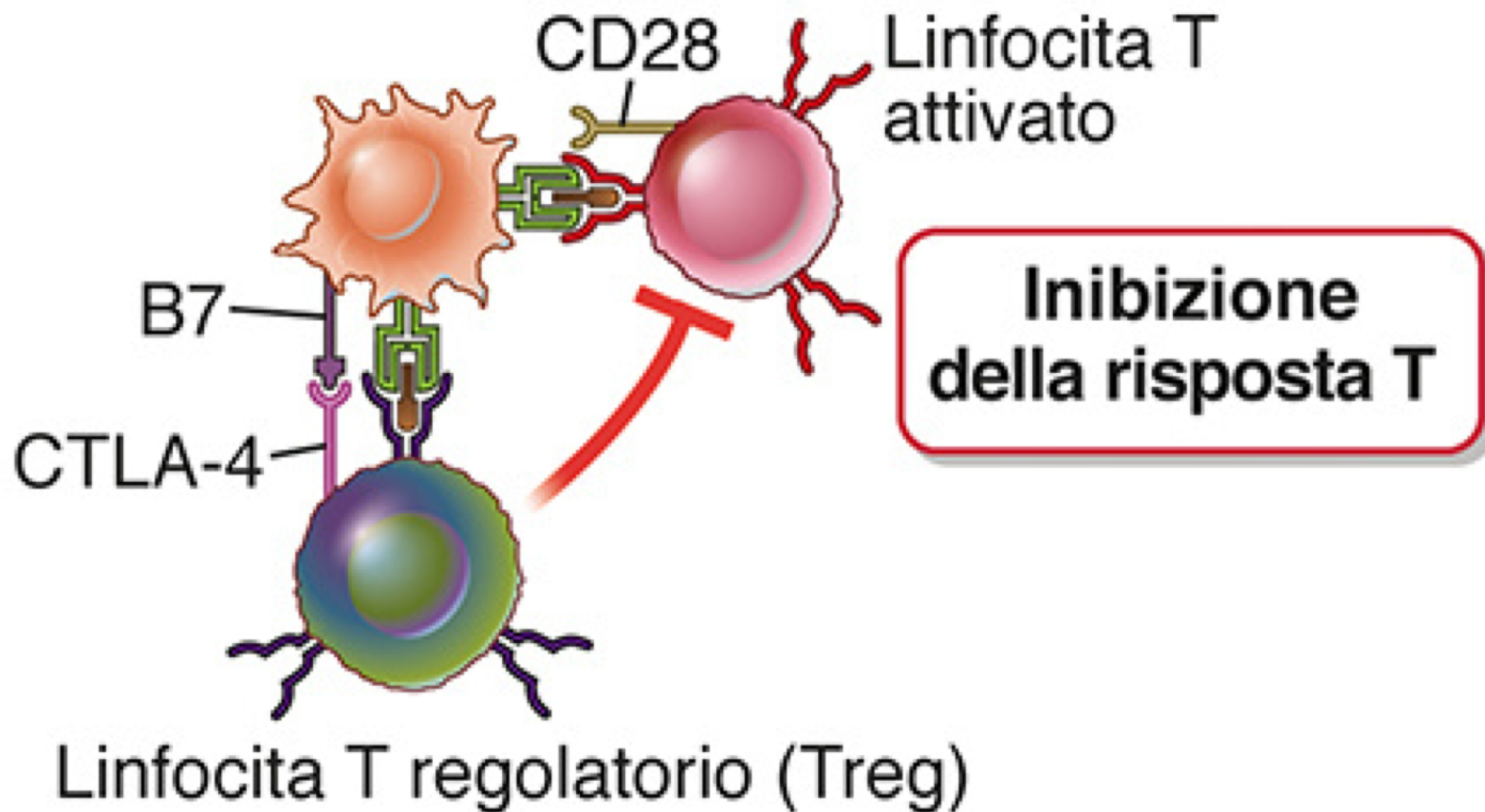


**Costimolazione ⇒  
attivazione  
linfocita T**



**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

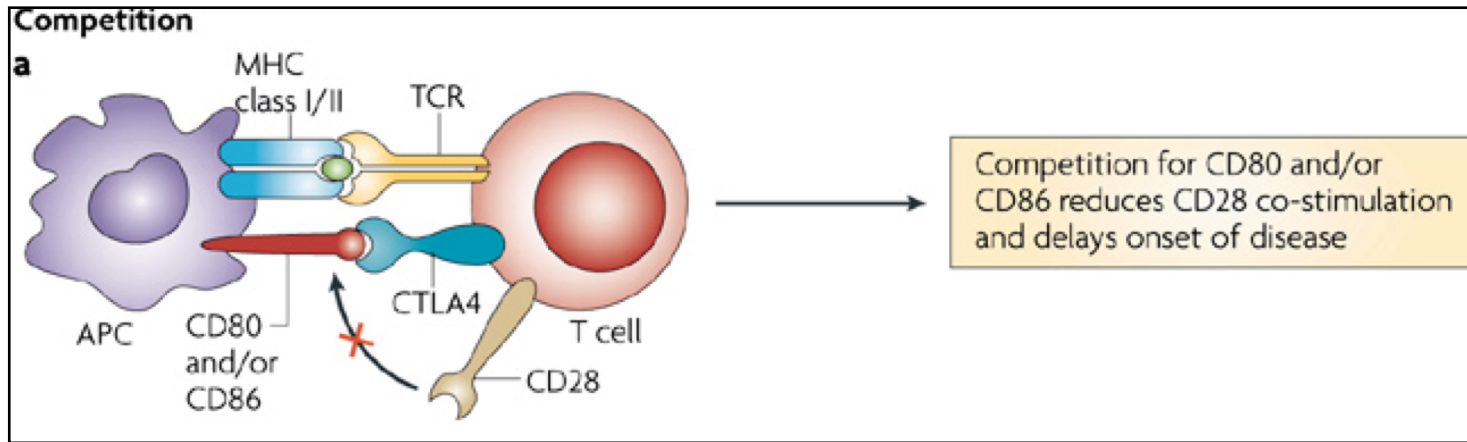
- Espresso dai linfociti T attivati da TCR/CD28 (dai T-memory) e costitutivamente dai Treg, una sottopolazione di linfociti T CD4<sup>+</sup> che sopprime la risposta immune.
- Protezione contro malattie autoimmuni (tolleranza periferica): topi knockout per CTLA4 sviluppano una sindrome linfoproliferativa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

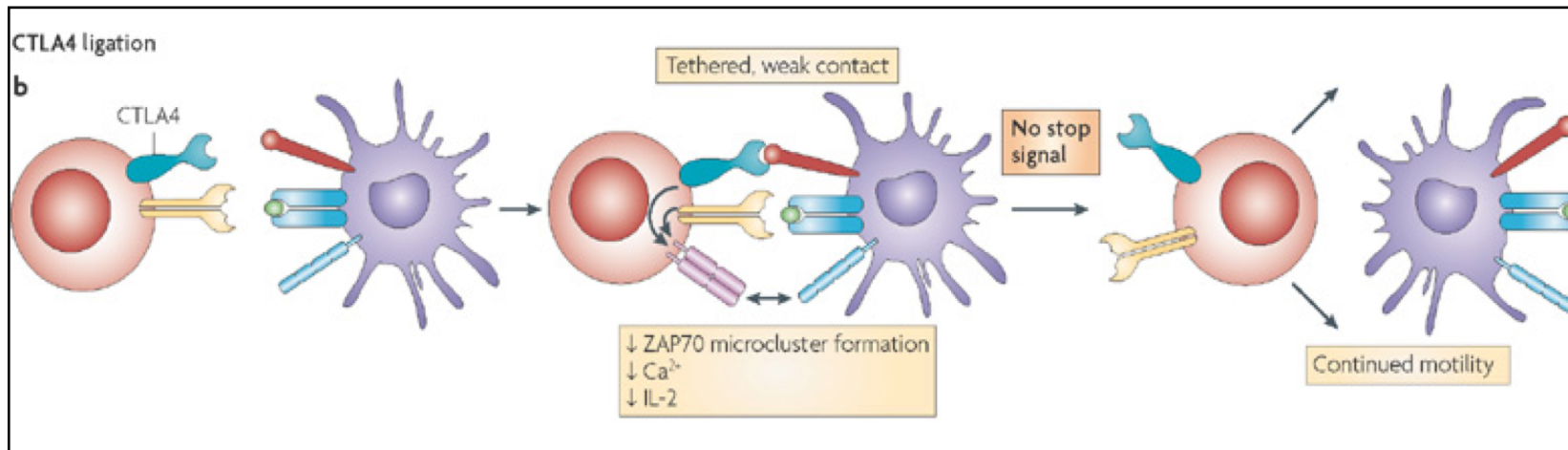
**2. Interferenza con il signalling e la formazione dei rafts lipidici:** il motivo **YVKM** recluta le fosfatasi **PP2A** e **SHP2**, che defosforilano le molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (Zap70, LAT, Vav)

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



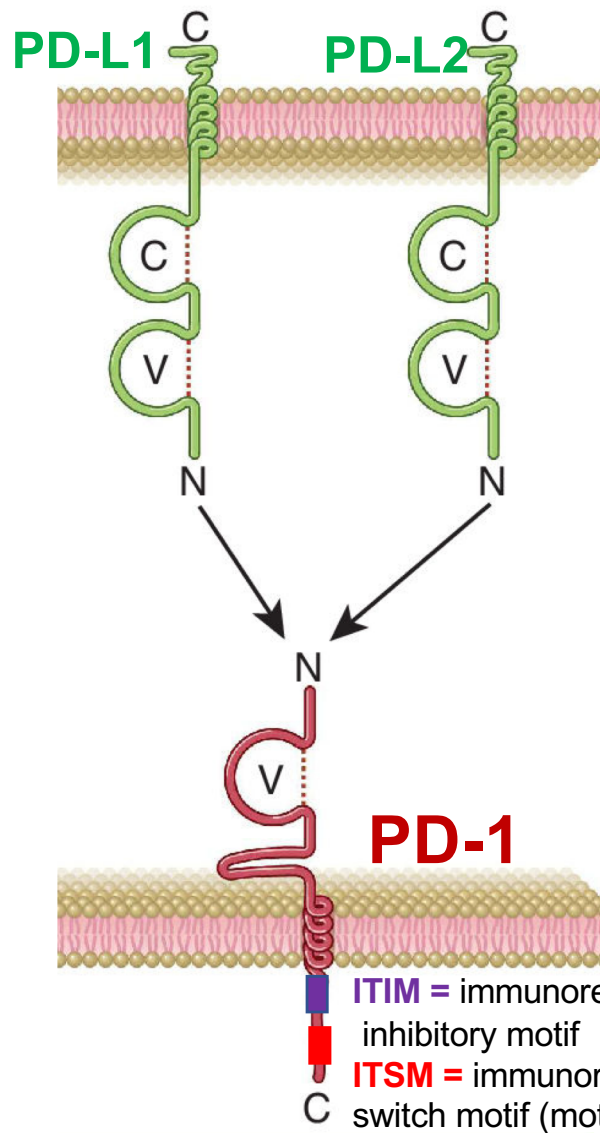
La maggiore affinità di CTLA4 per B7.1/B7.2 sequestra le molecole B7. Assenza di co-stimolazione CD28 → inibizione del TCR signalling

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



Totale defosforilazione dei substrati e MAPK

**YVKM** lega due fosfatasi: **SHP2** (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 SHP2 ha come bersaglio i residui di fosfotirosina, mentre PP2A defosforila i residui di serina e treonina.



## PD-1: recettore inibitorio

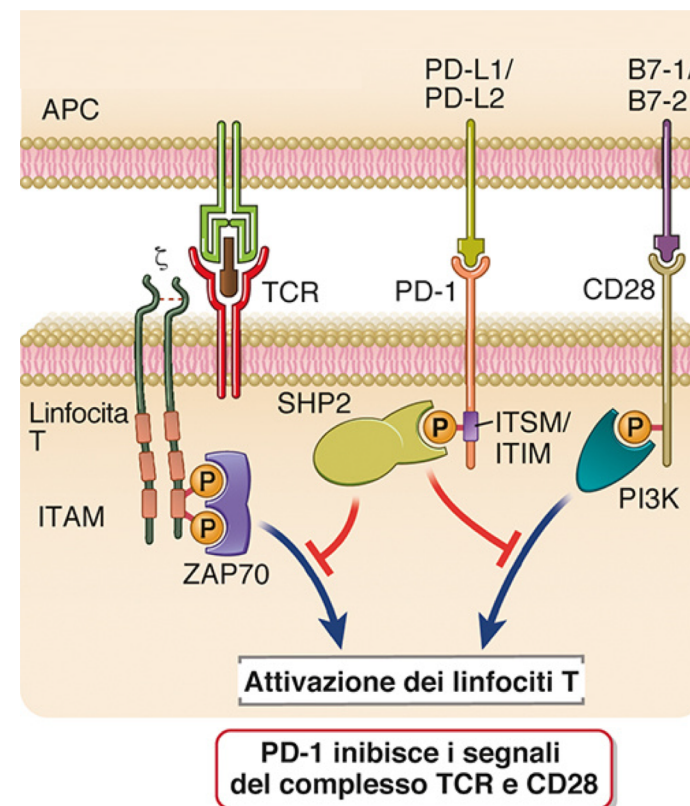
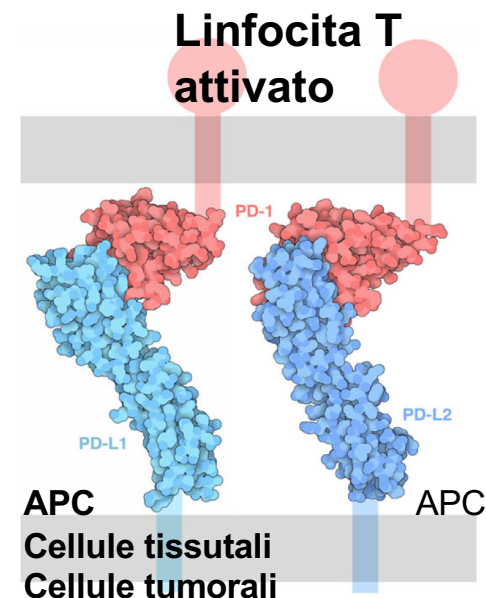
- **PD-1**, recettore inibitorio espresso sui linfociti effettori attivati in presenza di infezioni croniche persistenti o tumori, che riconosce i ligandi **PD-L1** e **PD-L2**

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

-**PD-L2** è espresso solo sulle APC

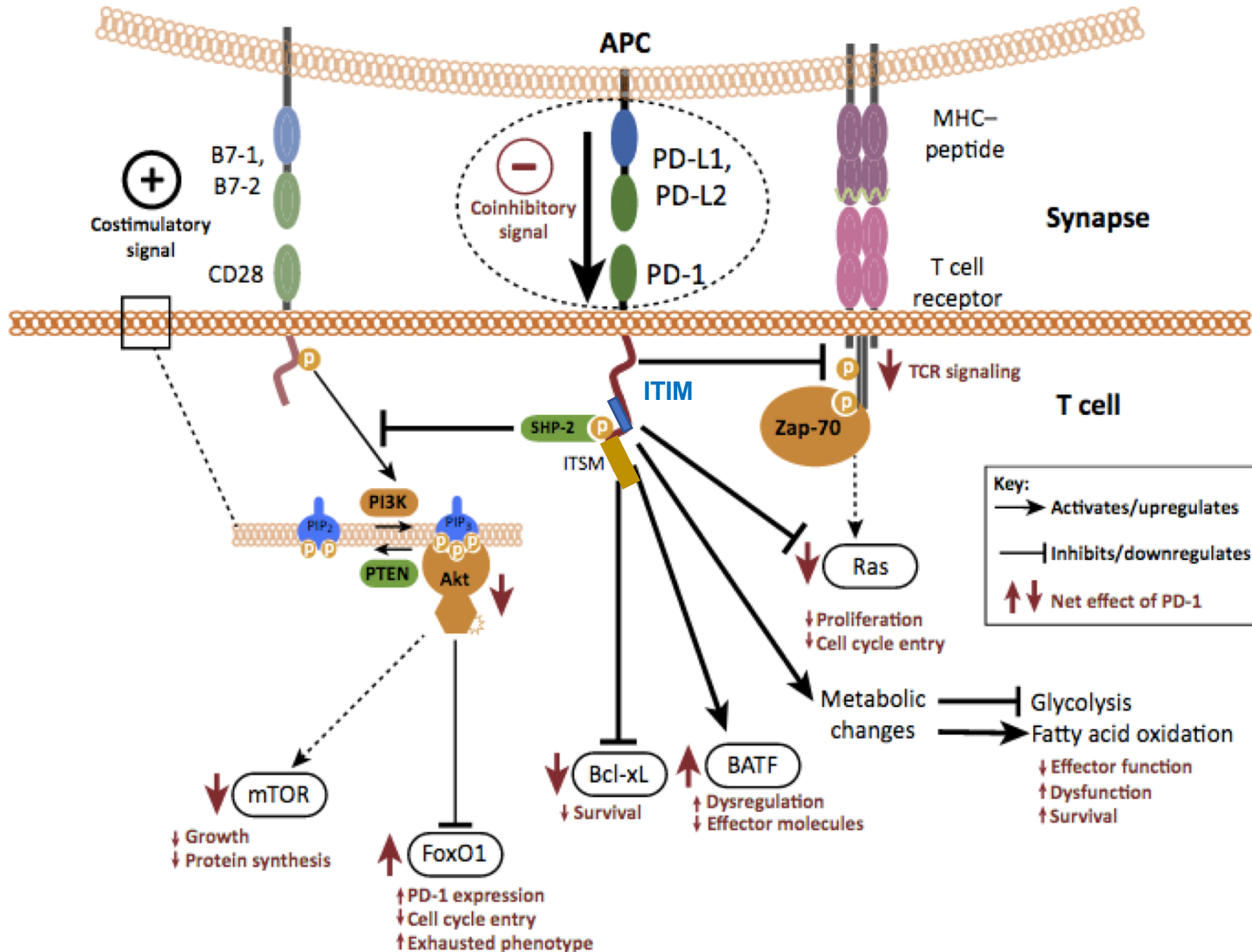
-Stimolazione di PD-1 porta all'inattivazione dei linfociti T

-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

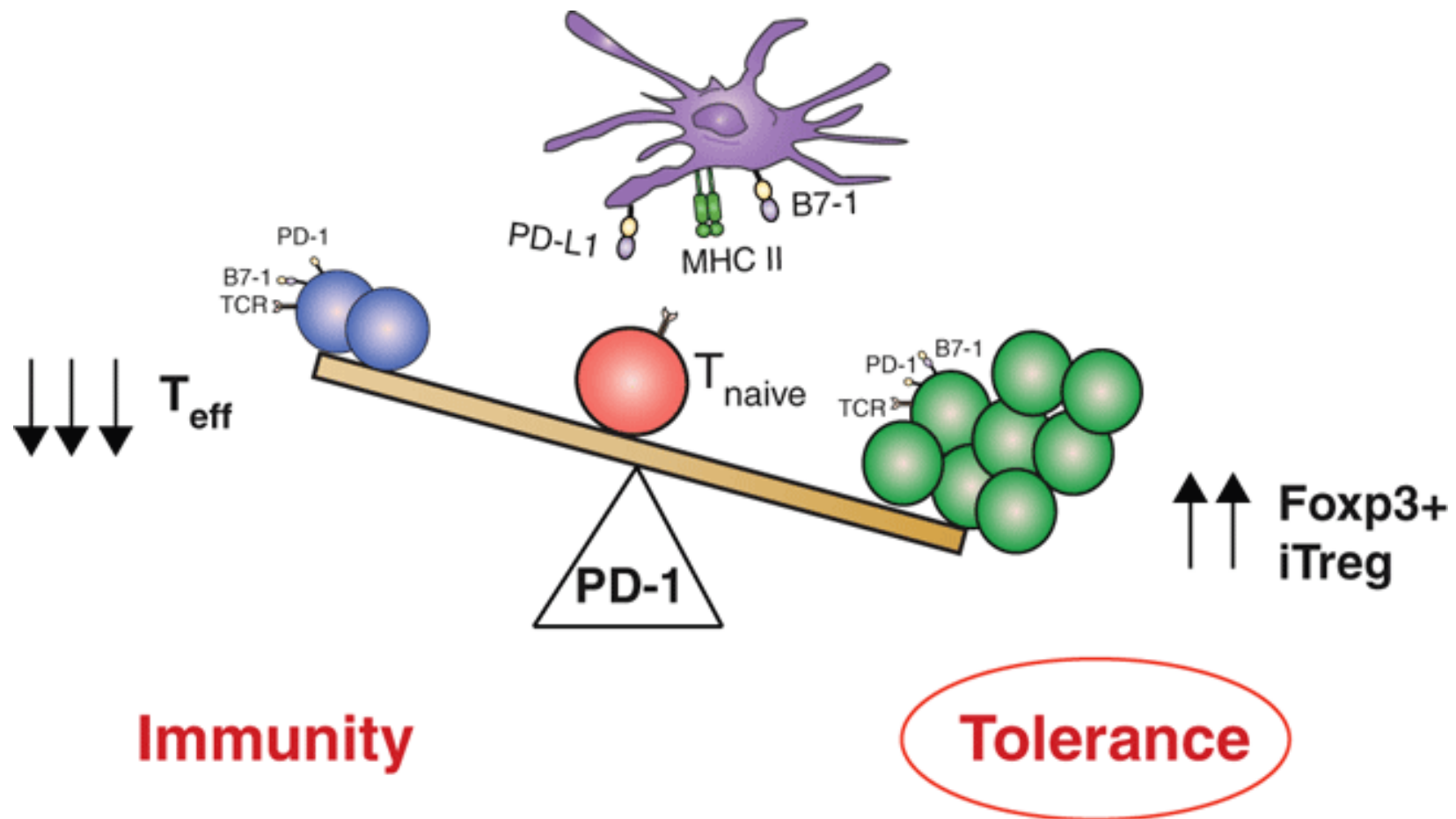
## Effetti:

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)

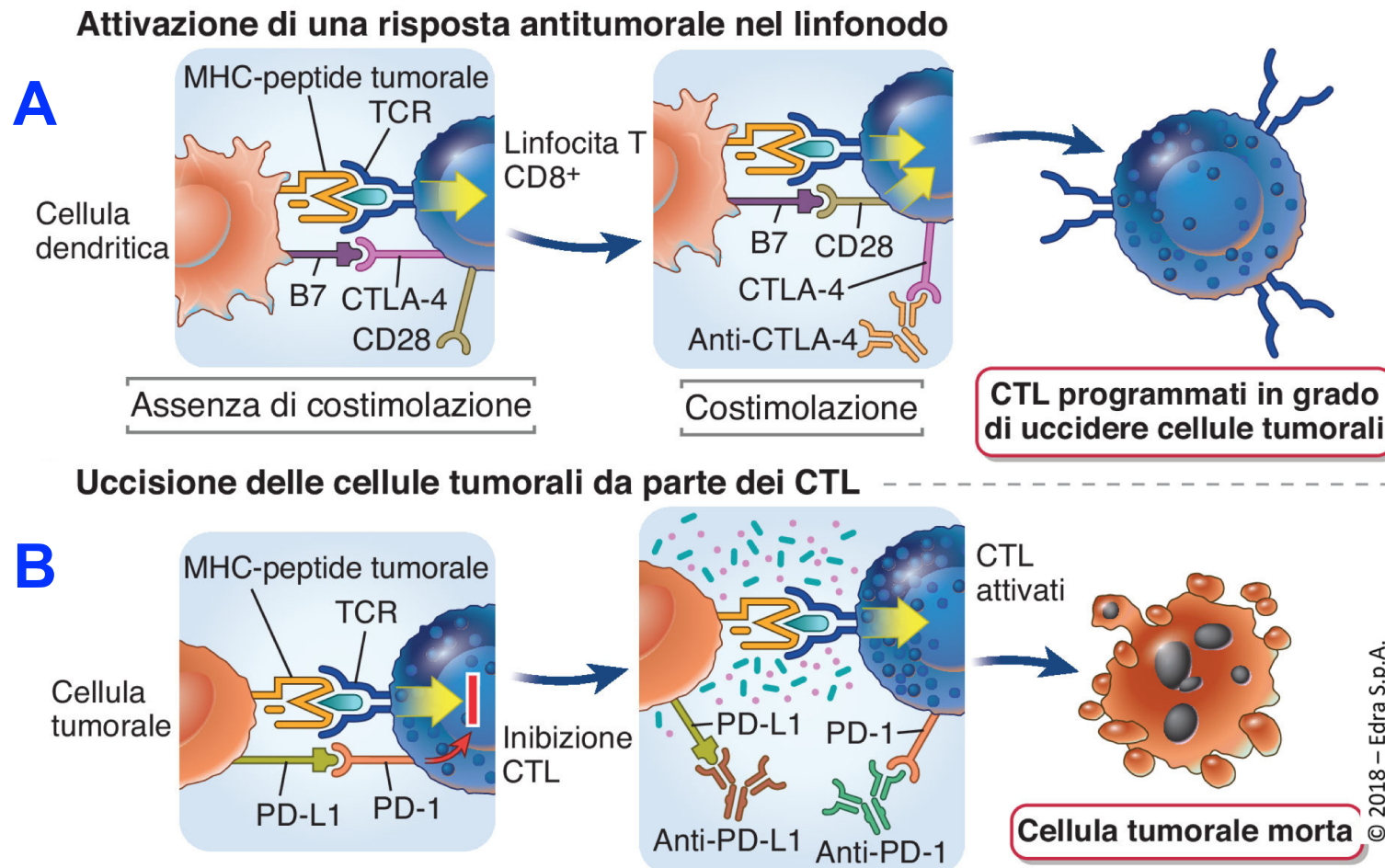
# Ruolo di PD1 nella tolleranza



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

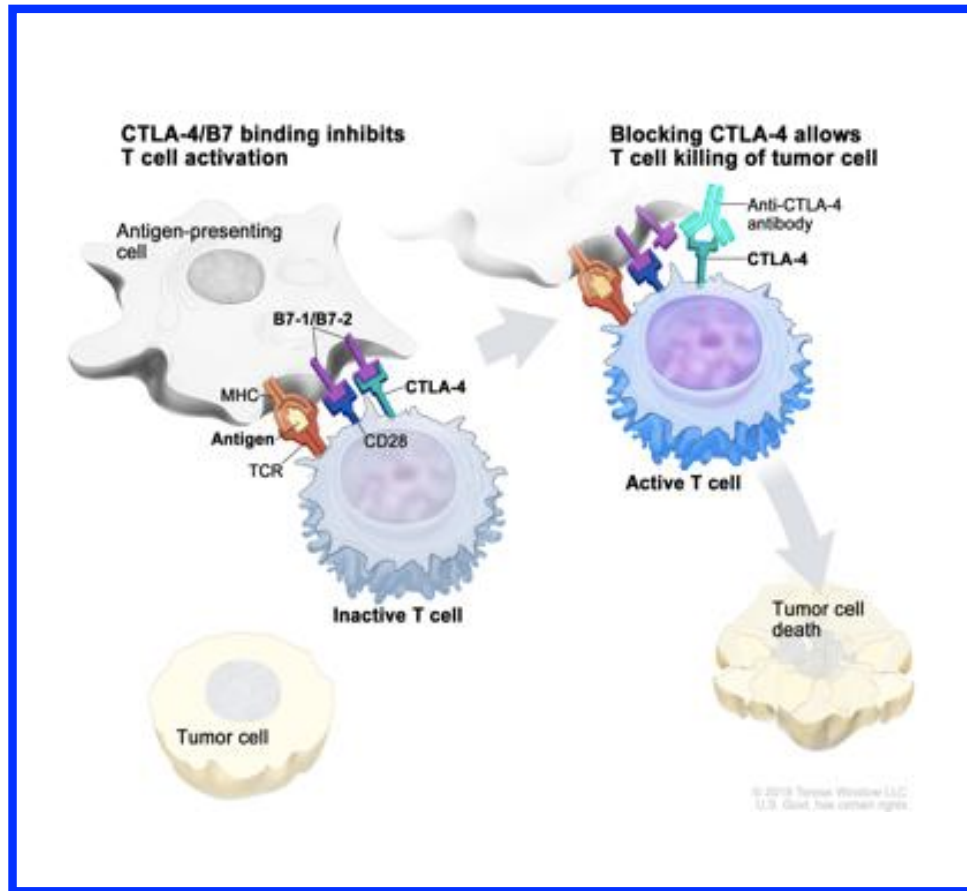
1. Modelli murini mostrano che le deficienze di **PD1** inducono patologie autoimmuni molto meno severe di quelle causate da inattivazione di **CTLA4**.
2. **CTLA4** regola l'attivazione iniziale dei linfociti T negli organi linfoidi secondari mentre **PD1** è deputato principalmente a spegnere le risposte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

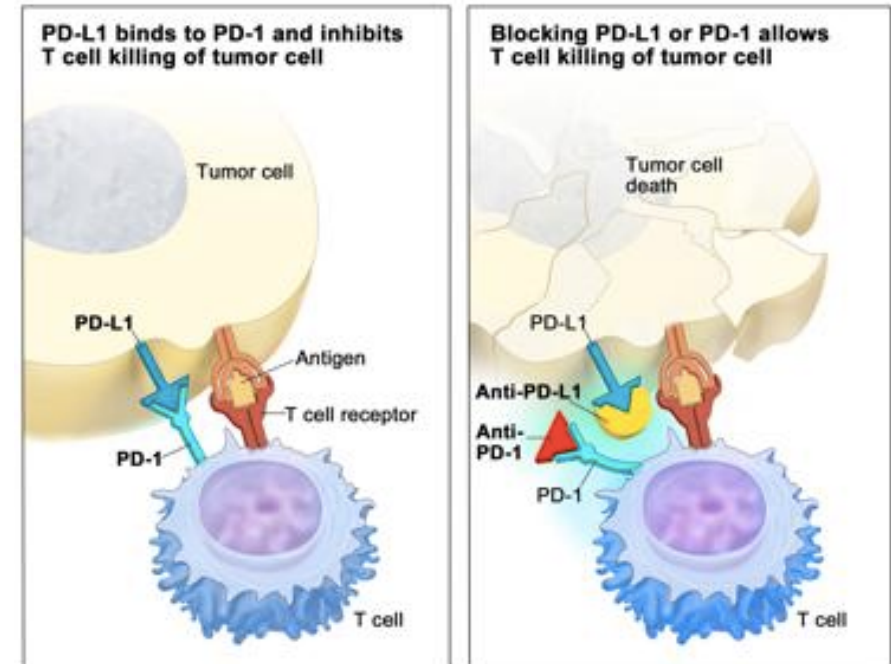


**Drugs = anti-CTLA-4 antibodies**

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**