

Corso di Immunologia e Immunopatologia - III anno
Prof. Paolini

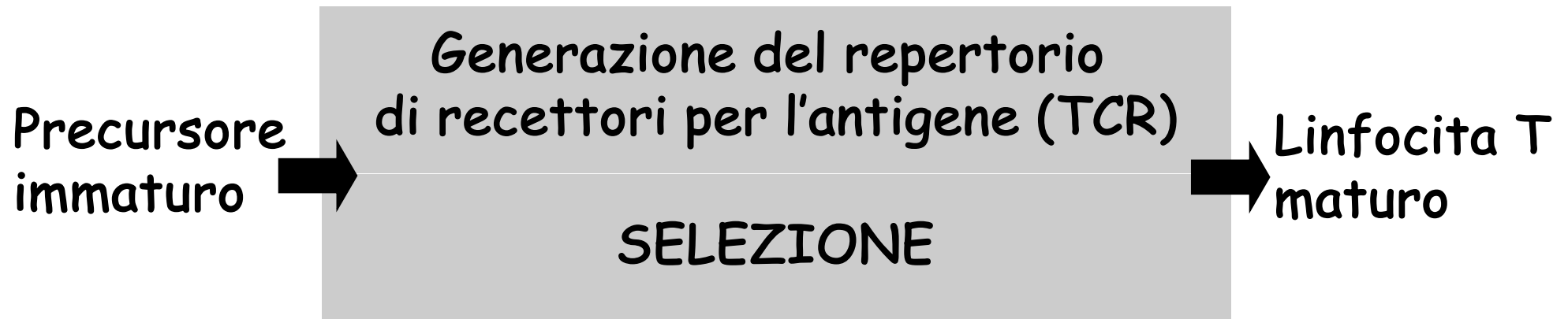
Lezione 22/10/2024

"La maturazione dei linfociti T"

Il materiale presente in questo documento viene distribuito esclusivamente ad uso interno e per scopi didattici.

LA DIFFERENZIAZIONE TIMICA DEI LINFOCITI T

TIMO



•RESTRIZIONE AL SELF

Capacità di riconoscere nel contesto di molecole MHC self

•TOLLERANZA AL SELF

Incapacità di reagire nei confronti di antigeni self

L'organizzazione cellulare del timo

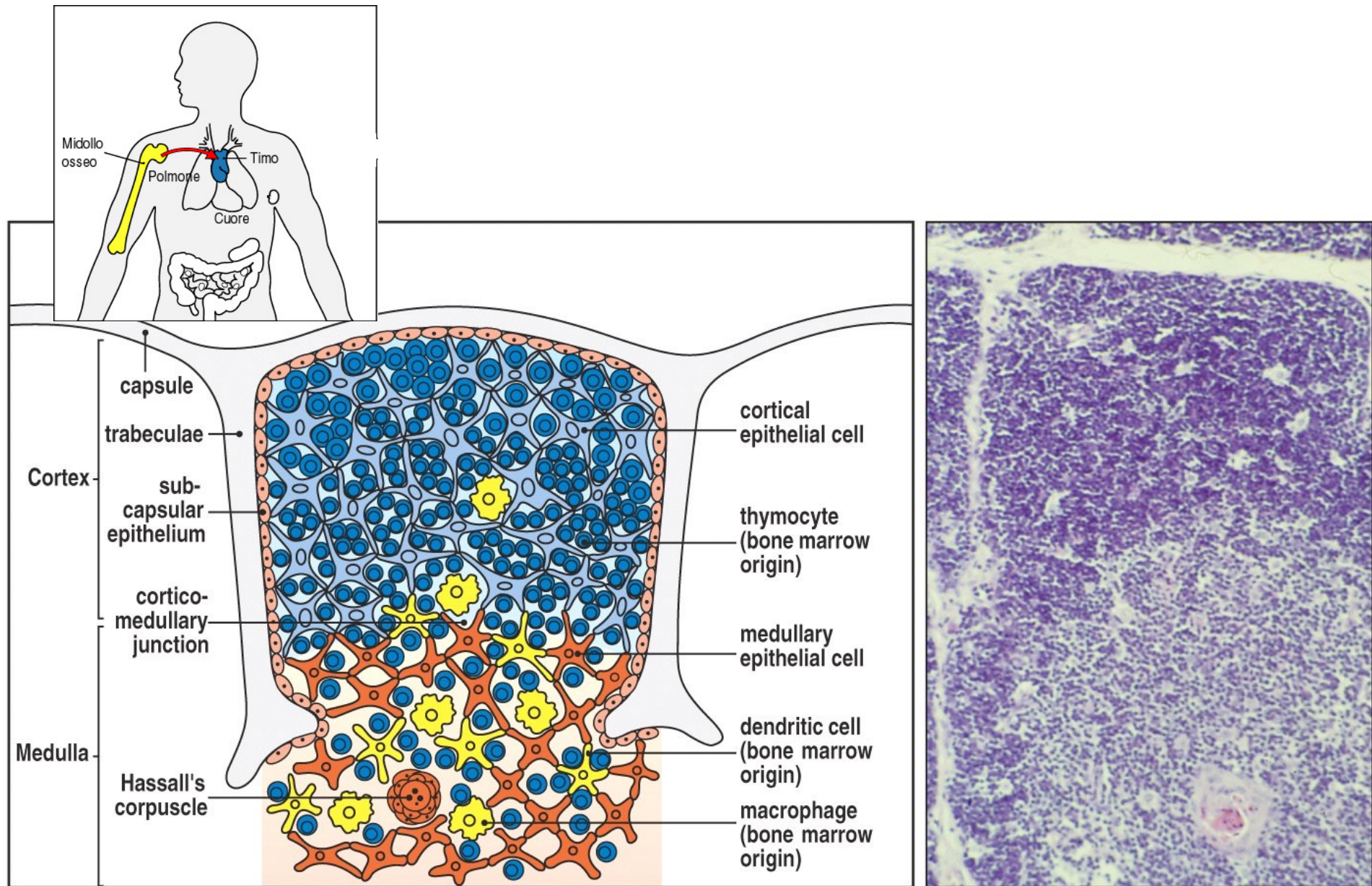


Figure 7-8 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Il timo è necessario per lo sviluppo dei linfociti T

- Topi nudi

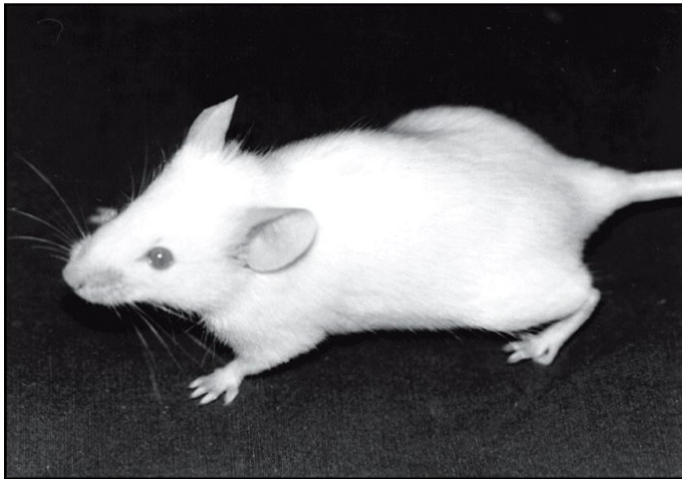
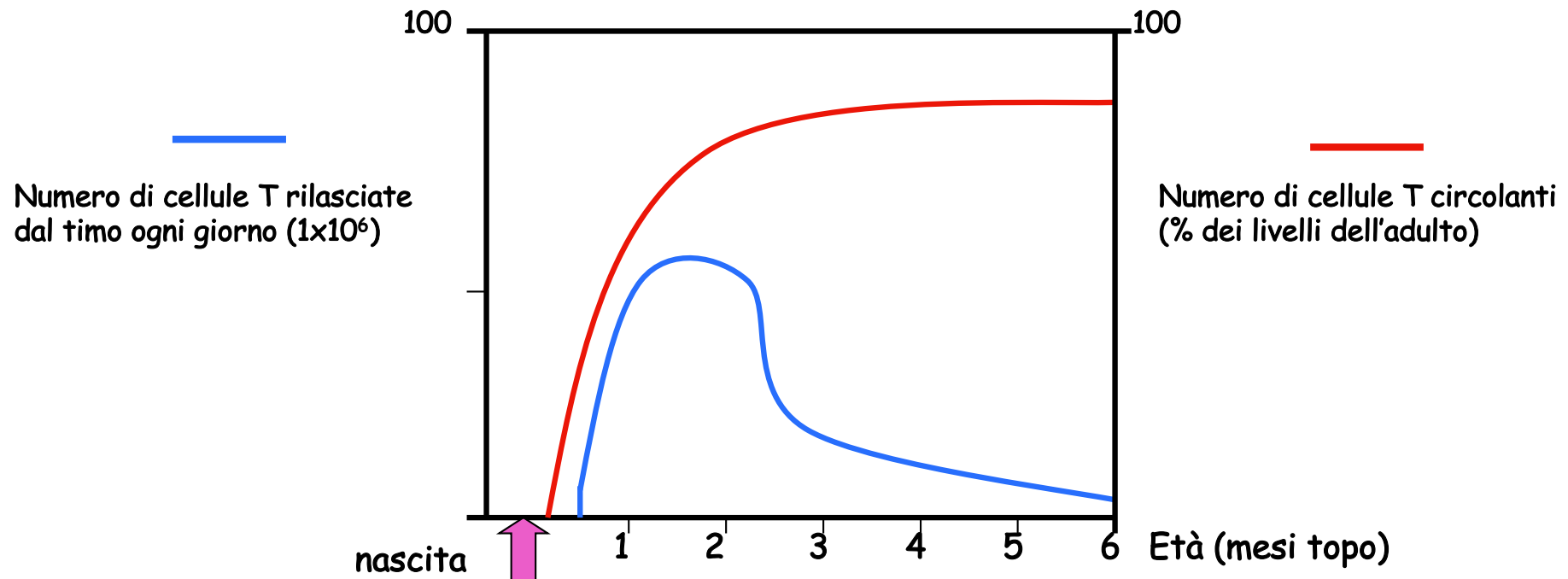
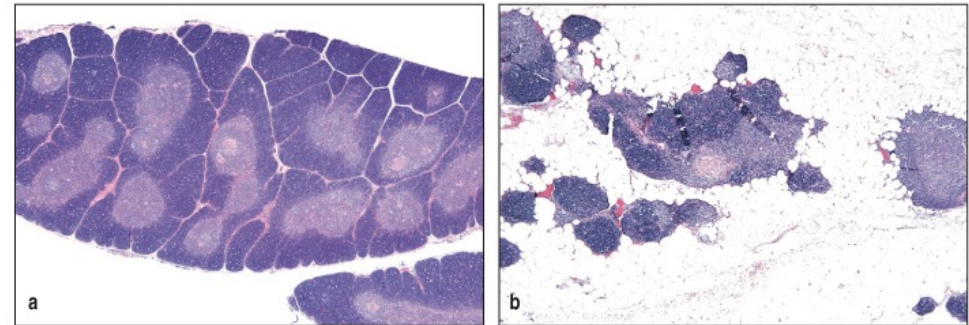
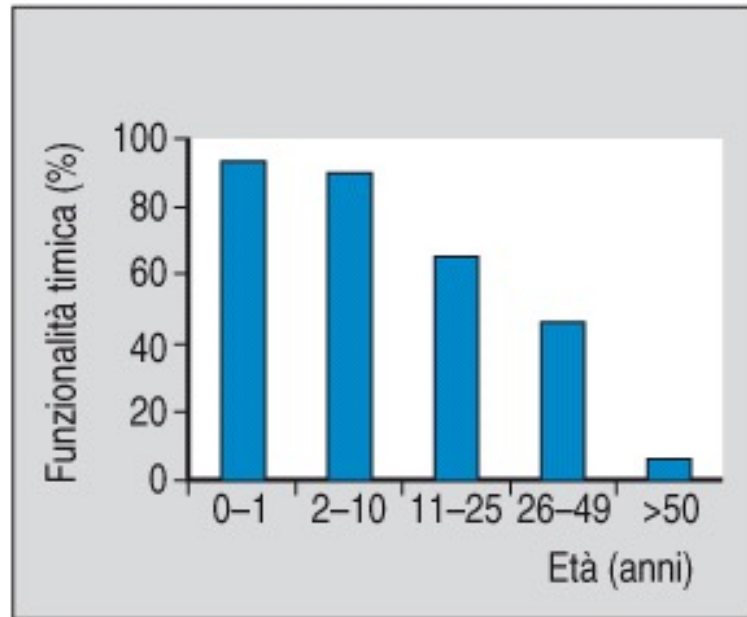


Figure 7-10 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

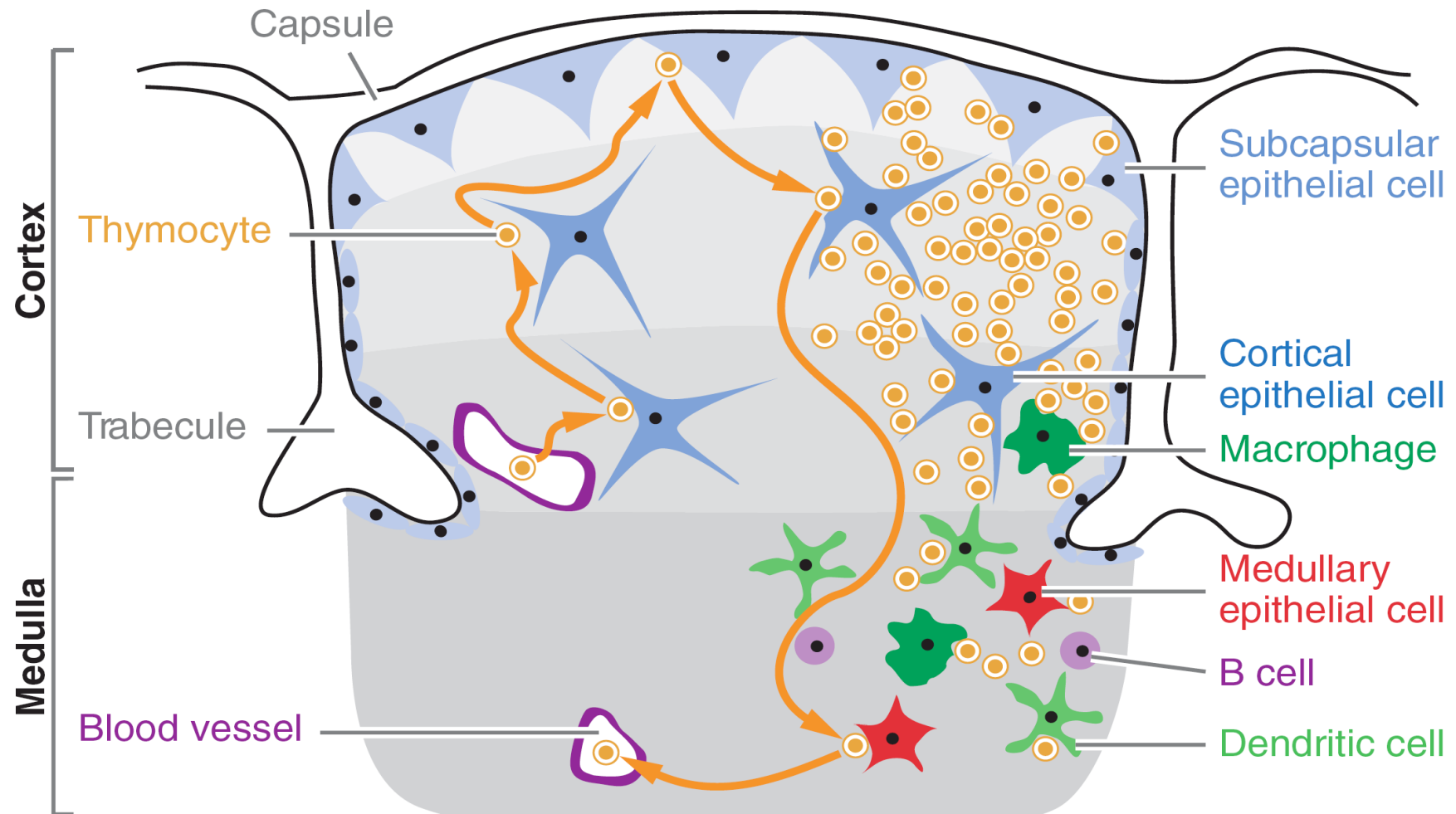
Il timo regredisce dopo la nascita



I timociti durante il processo di differenziamento

- **Migrano**
- Contattano le cellule stromali
- Cambiano fenotipo
- Esprimono un recettore per l'antigene
- Subiscono un processo di selezione

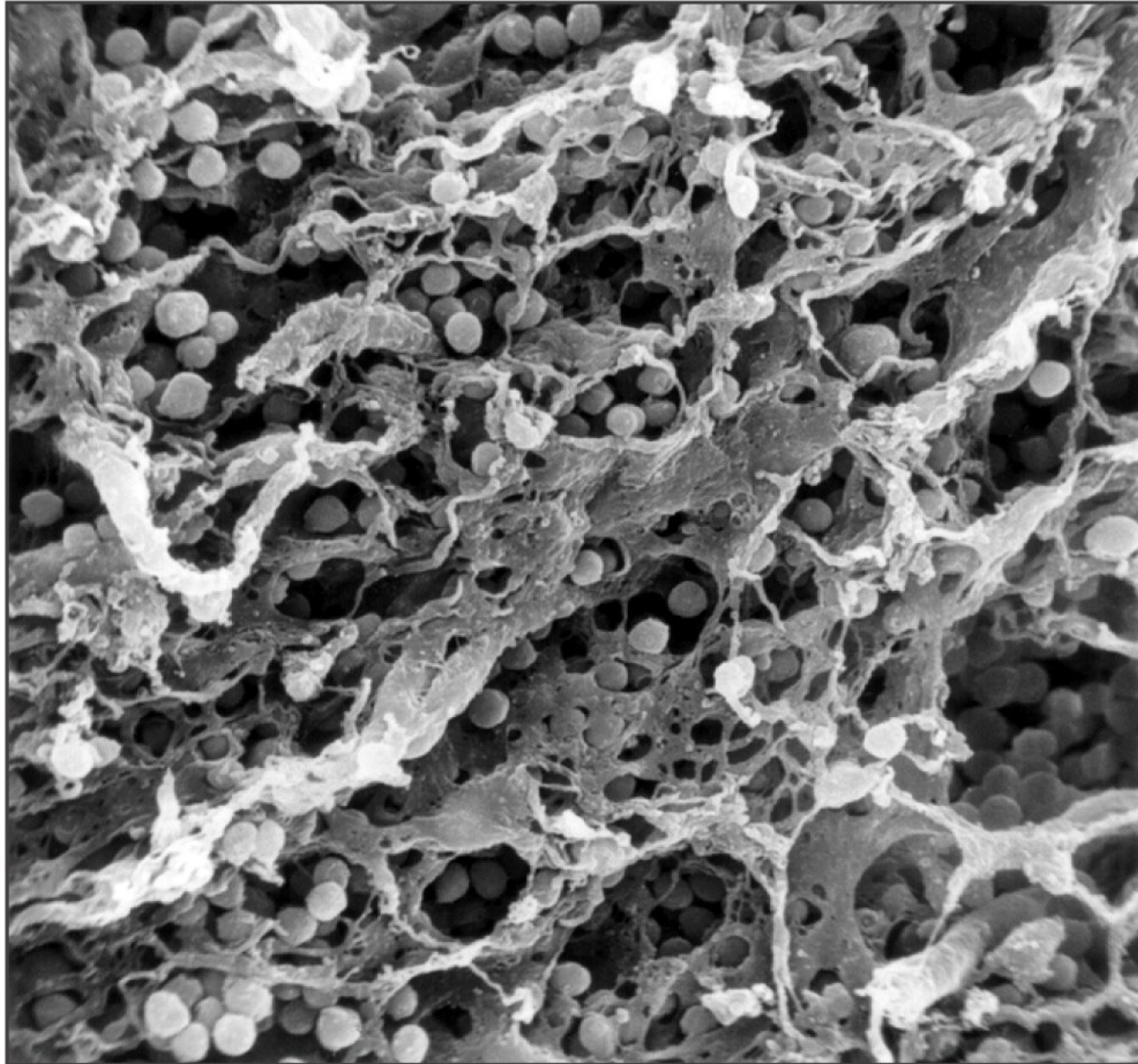
Durante la maturazione i timociti si muovono dalla regione subcapsulare più esterna verso la regione midollare più interna



I timociti durante il processo di differenziamento

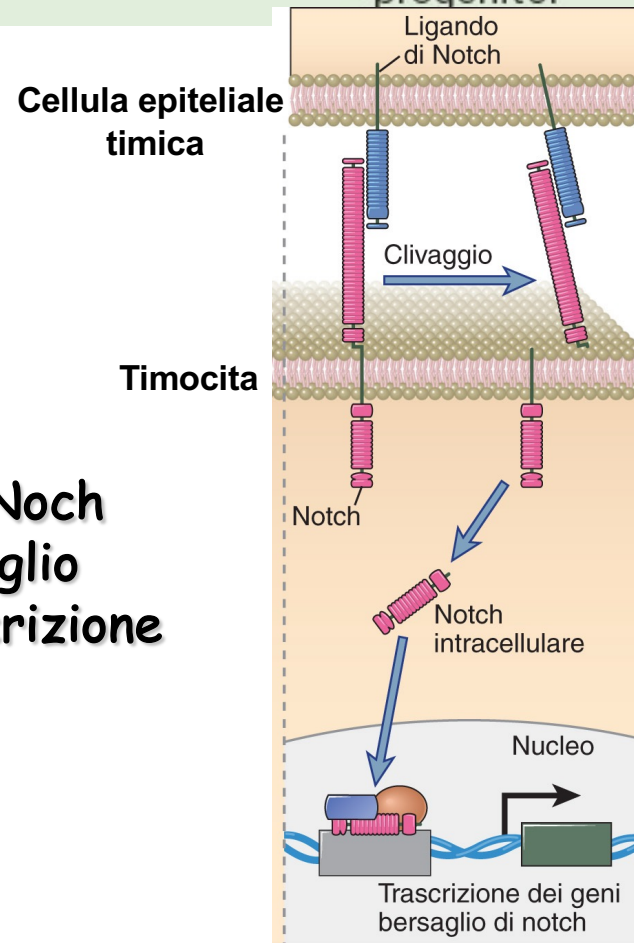
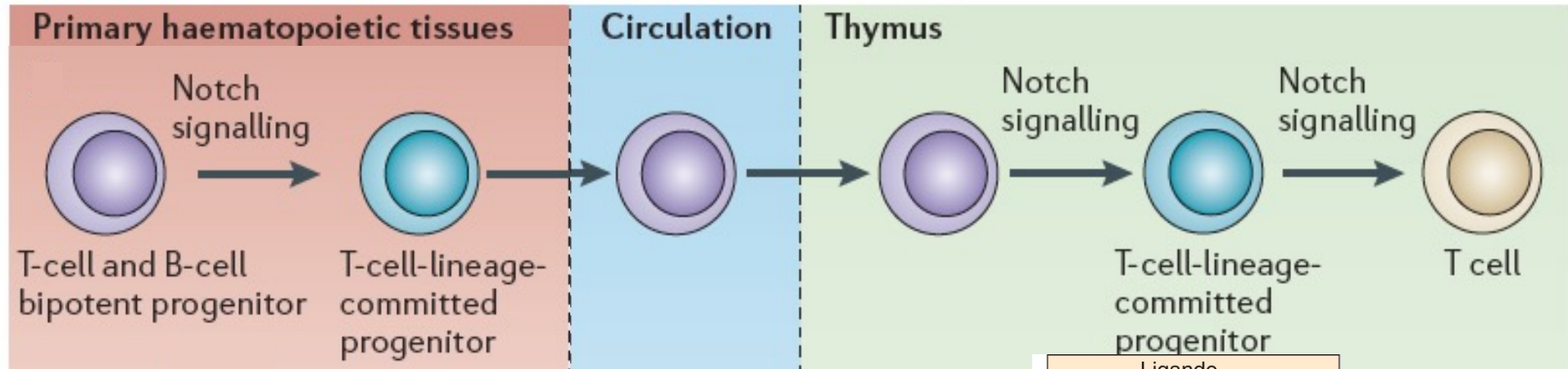
- Migrano
- **Contattano le cellule stromali**
- Cambiano fenotipo
- Esprimono un recettore per l'antigene
- Subiscono un processo di selezione

THE EPITHELIAL CELL NETWORK



Stage 1: Commitment

Control of development by transcriptional factors

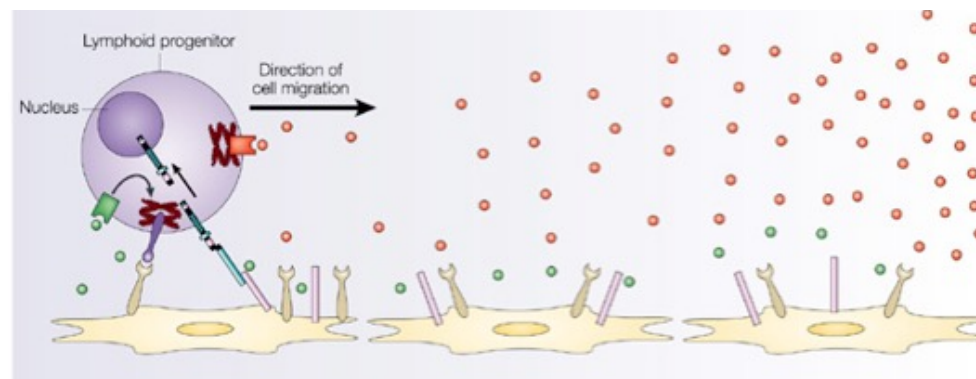


Dopo aver riconosciuto il suo ligando Noch cambia conformazione, subisce un taglio proteolitico e agisce da fattore di trascrizione

Stage 2: Proliferation

Le interazioni con le cellule epiteliali timiche e le **CITOCHINE** presenti nel timo:

- mantengono la sopravvivenza dei timociti
- stimolano la proliferazione
- guidano la migrazione attraverso il timo



INTERLEUCHINA 7

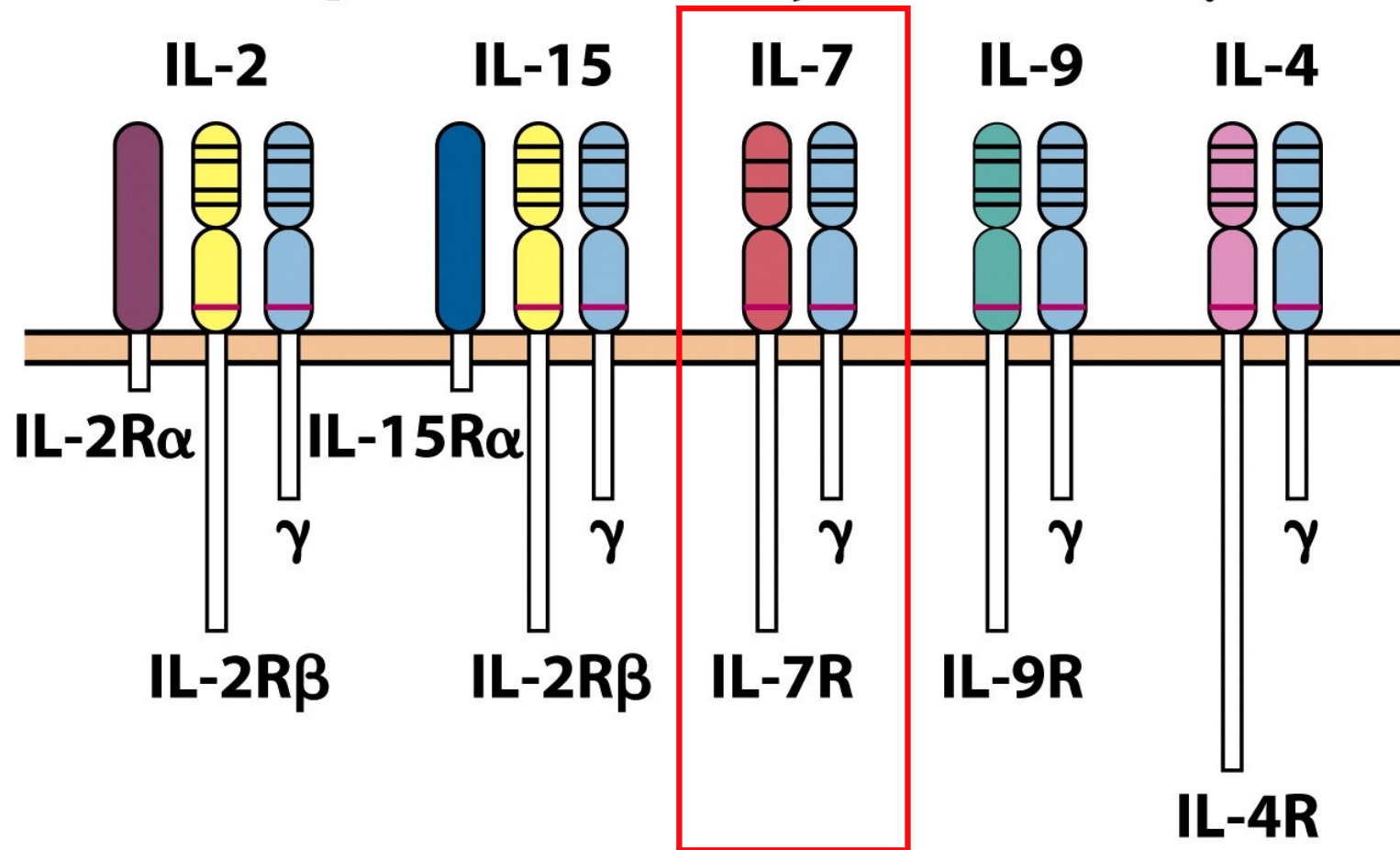
Fonte : cellule epiteliali timiche

Cellule bersaglio : timociti immaturi

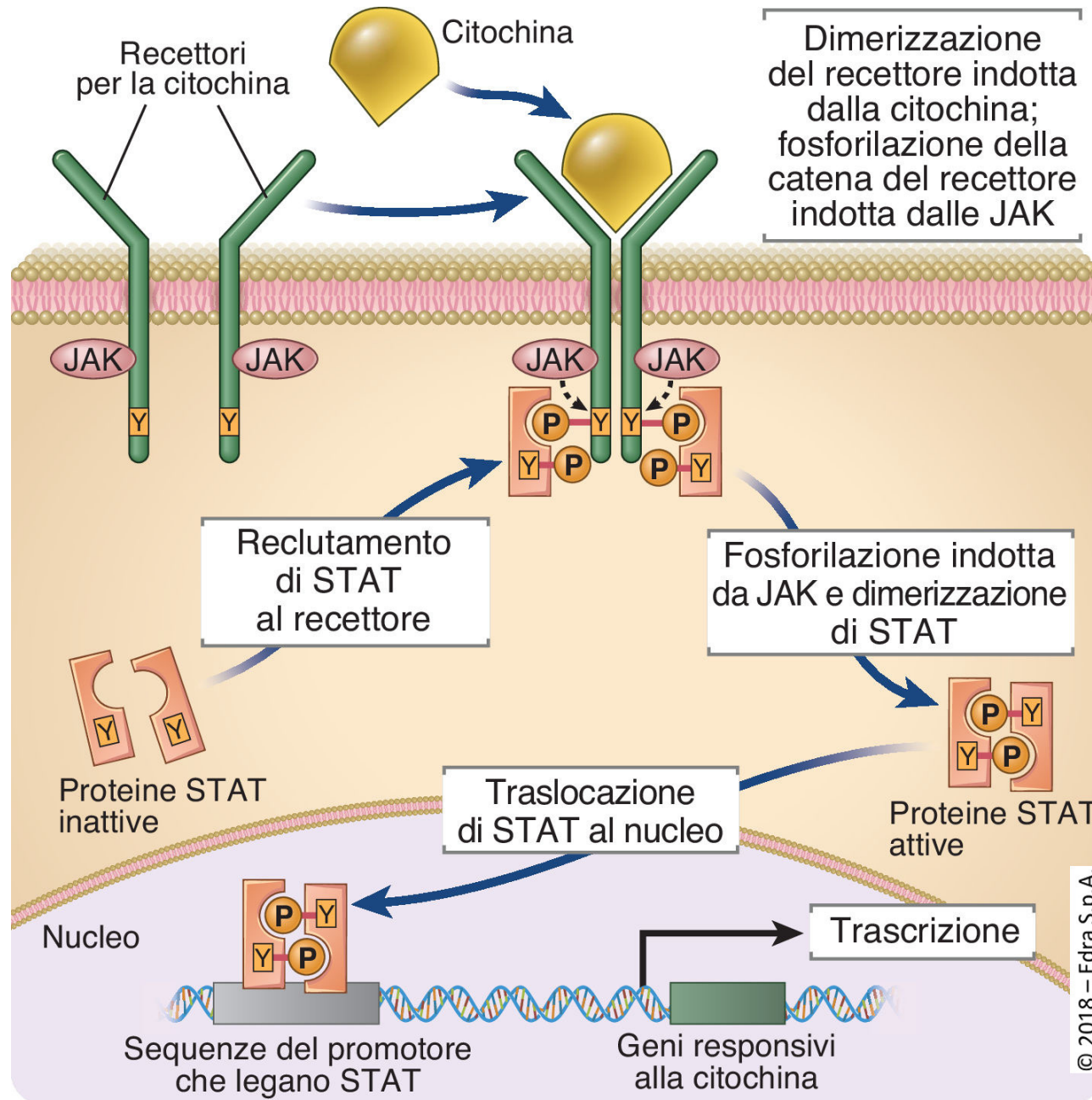
Azione principale : proliferazione dei precursori linfoidi

Il recettore per IL-7 e le citochine di tipo I:

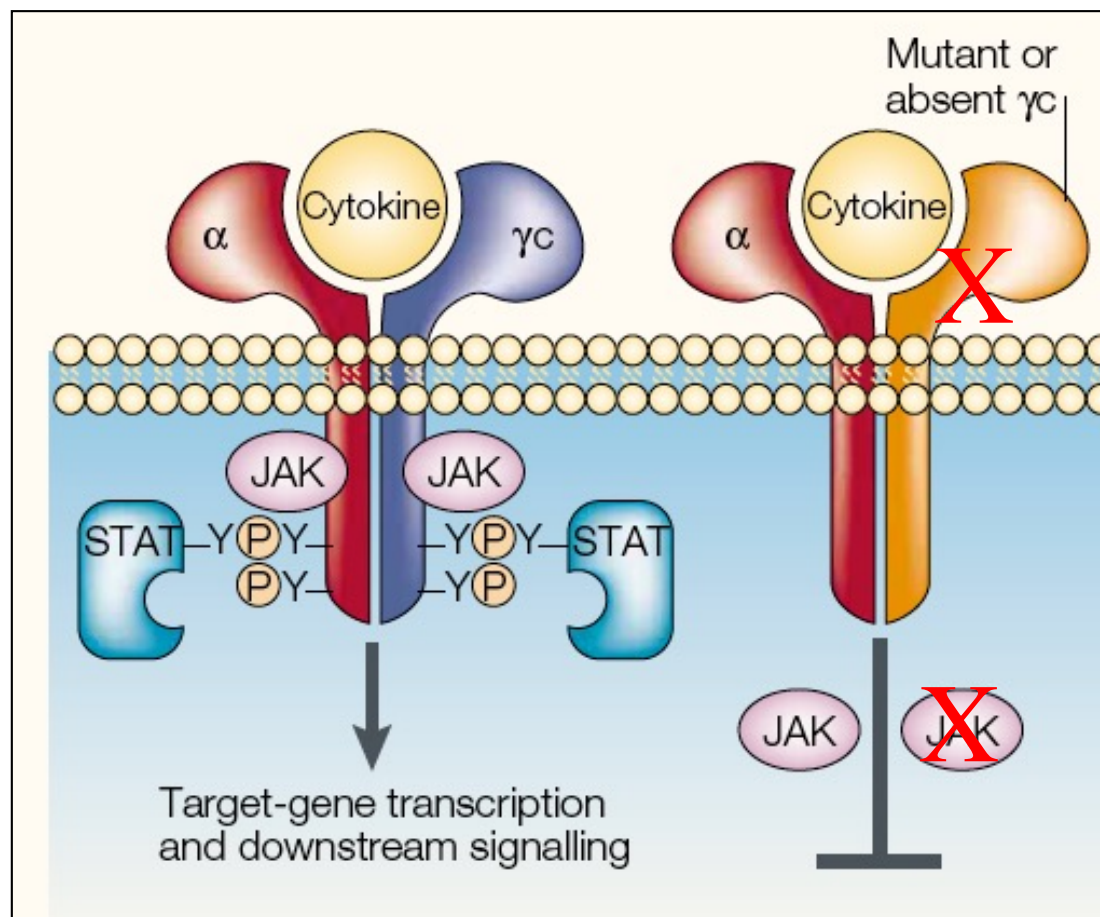
IL-2 receptor subfamily (common γ subunit)



Trasduzione del segnale promossa dalle citochine tramite JAK-STAT



Mutazioni che colpiscono la catena γ comune, o meno frequentemente JAK3, si traducono in difetto nello sviluppo dei linfociti T



I timociti durante il processo di differenziamento

- Migrano
- Contattano le cellule stromali
- **Cambiano fenotipo**
- Esprimono un recettore per l'antigene
- Subiscono un processo di selezione

TCR: il recettore per l'antigene dei linfociti T

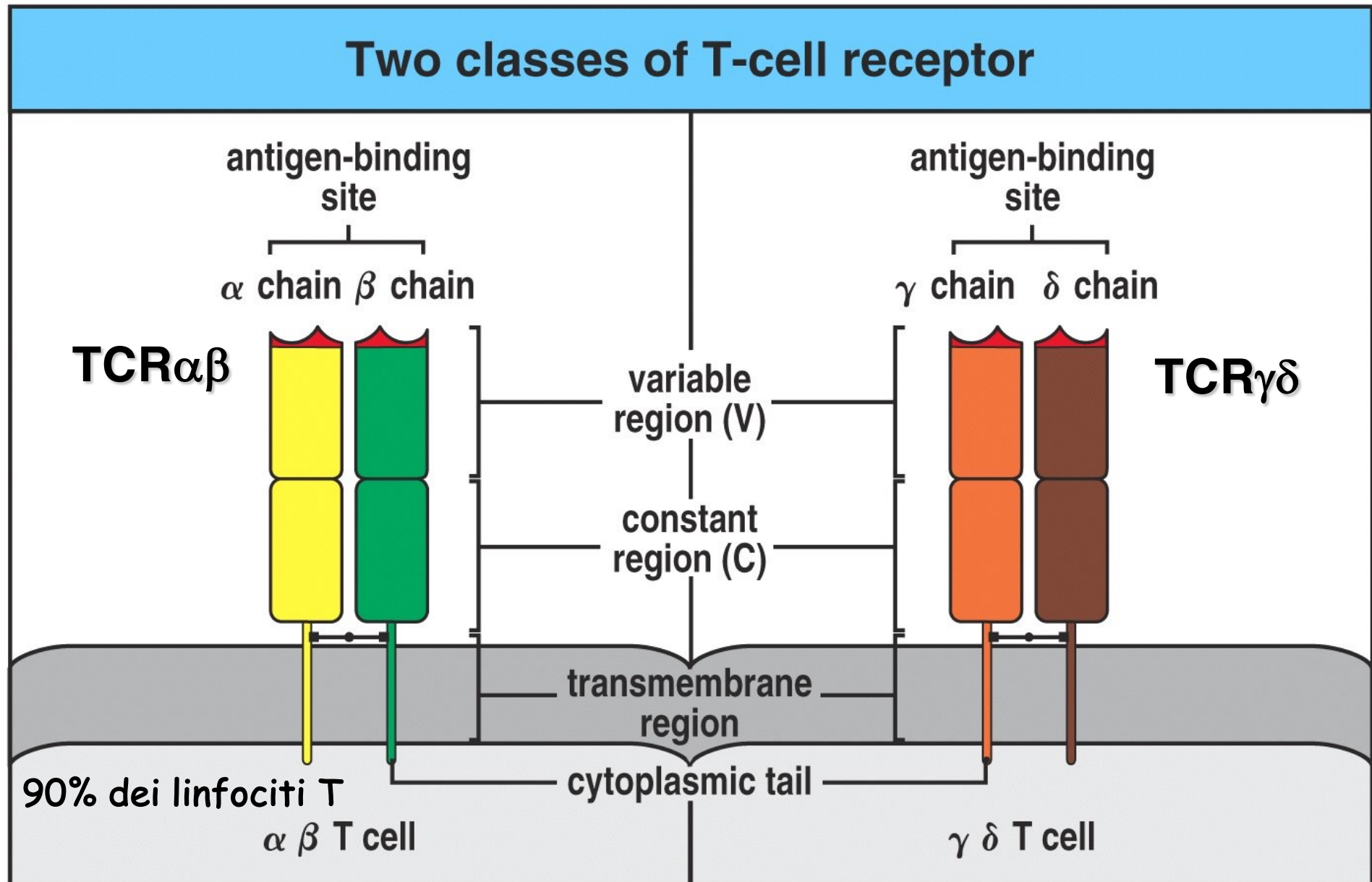
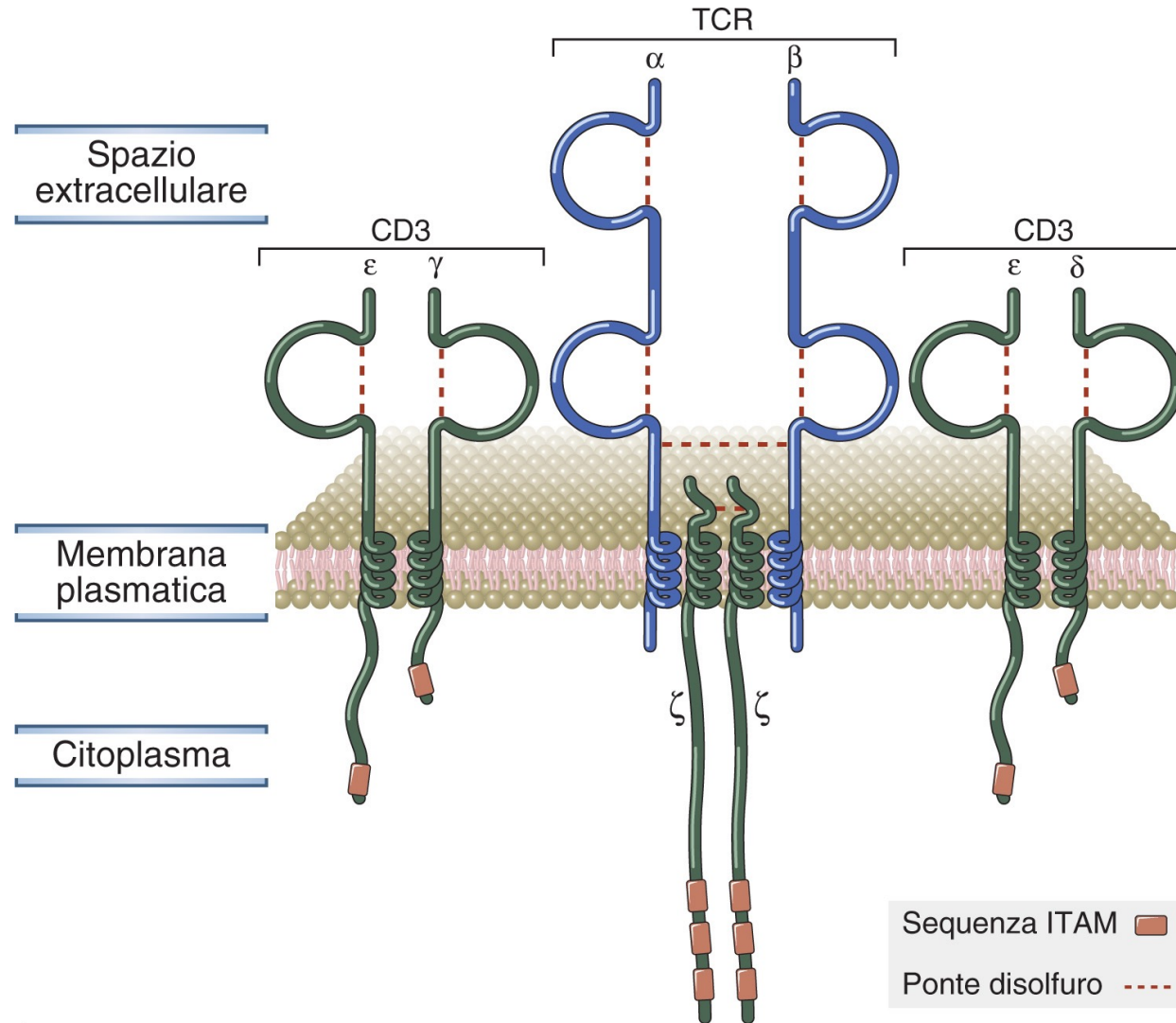


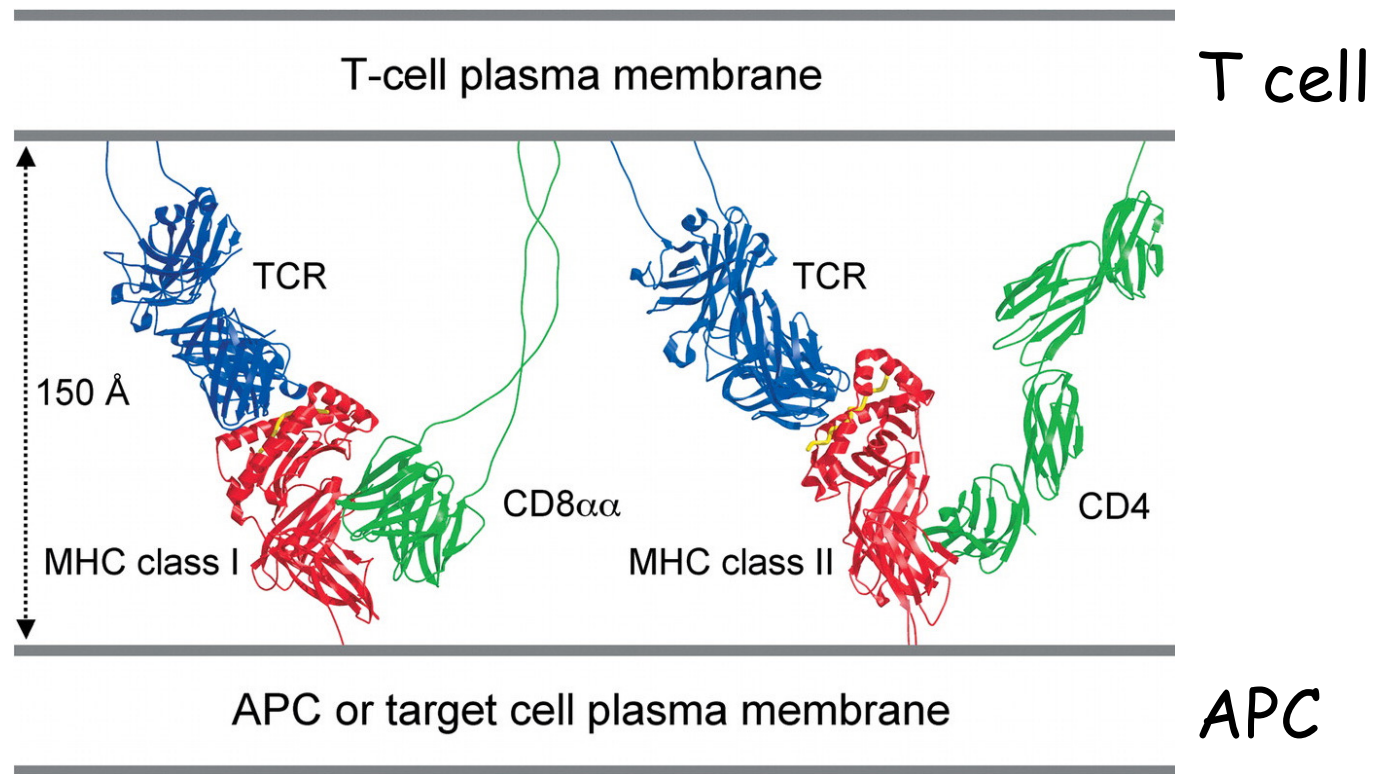
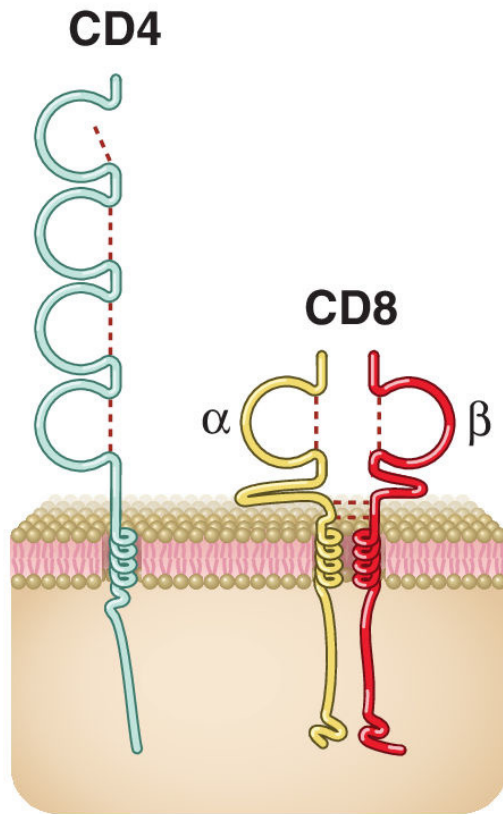
Figure 3-7 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Il complesso recettoriale dei linfociti T

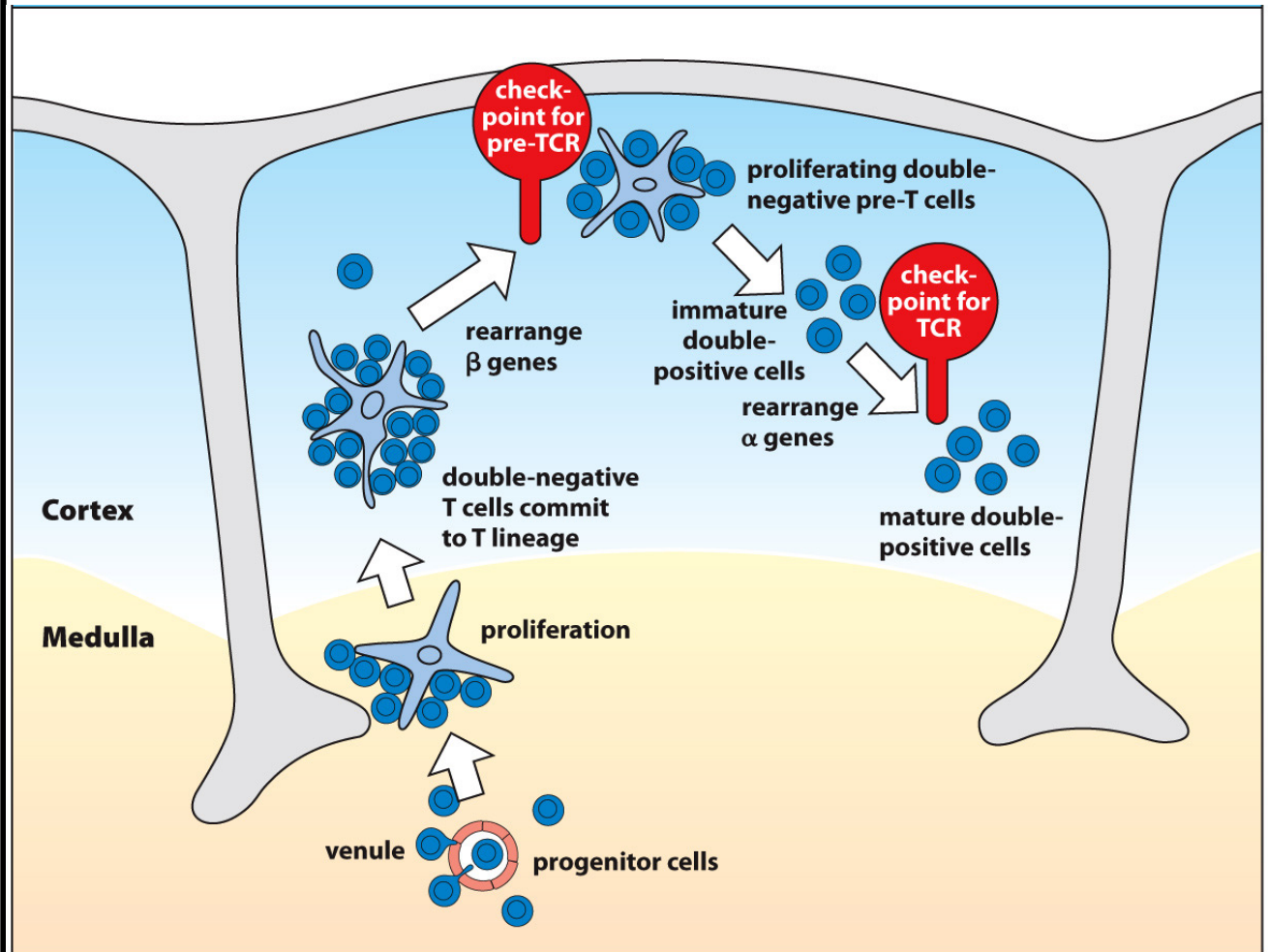
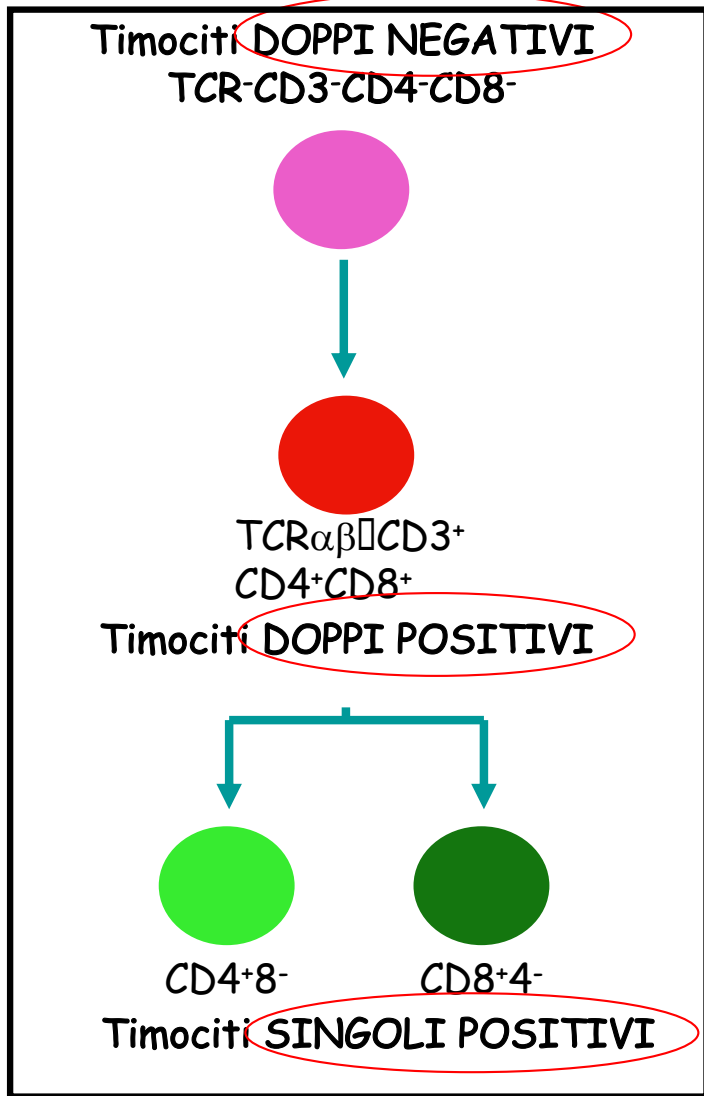


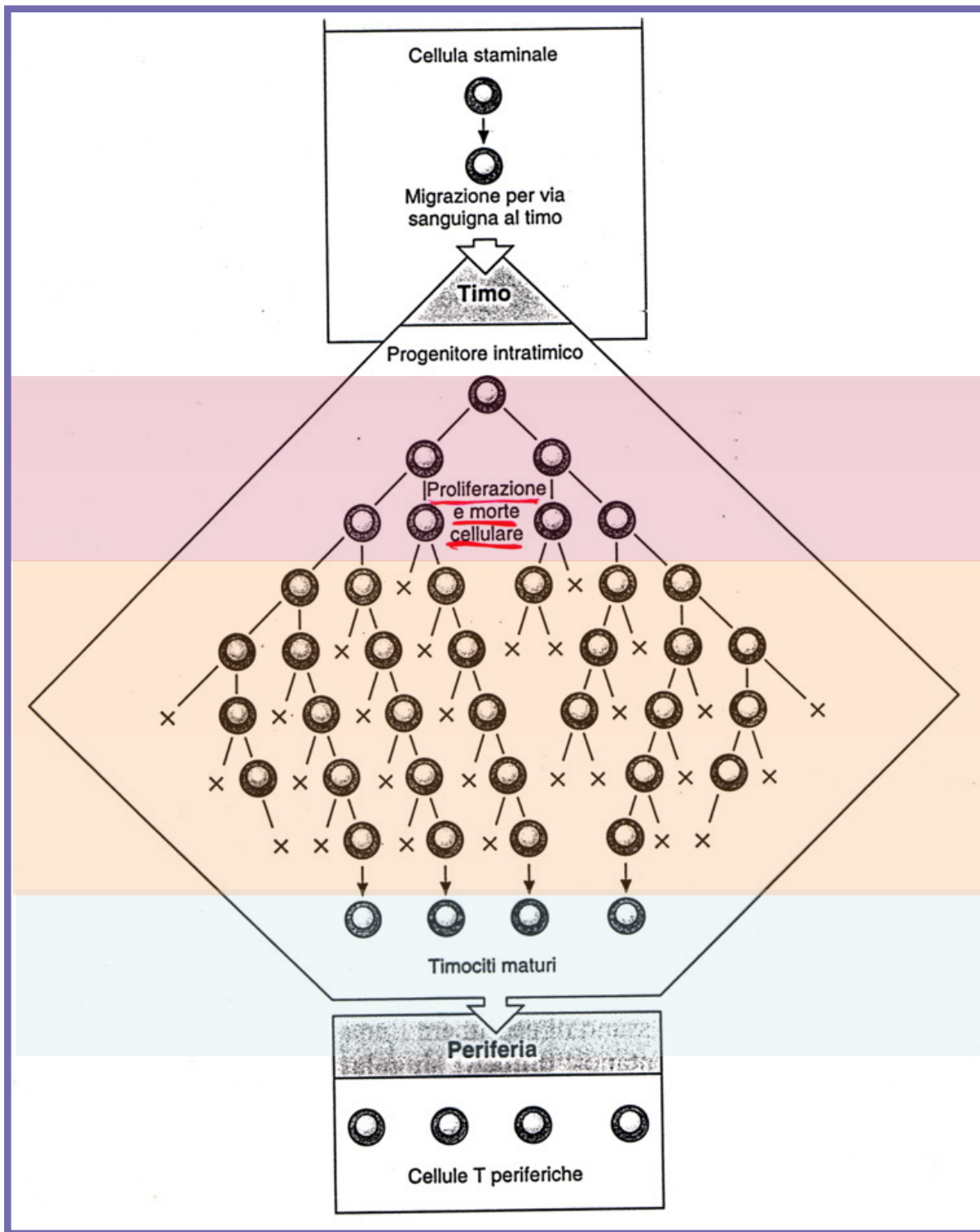
- Tutti i TCR sono espressi in associazione ad un complesso CD3
- Il TCR alfa/beta riconosce il complesso MHC/peptide
- Il complesso CD3 trasduce un segnale

I corecettori CD4 and CD8 partecipano al legame



L'espressione del CD4 e del CD8 permette di definire stadi maturativi diversi





T cells mature in the thymus
but most die there !

CD4-CD8- DN **5%**

CD4+CD8+ DP **80%**

CD4+ or CD8+ SP **15%**

Young adult:
~ 5×10^7 thymocytes produced/day
~ 2×10^6 mature cells leave/day

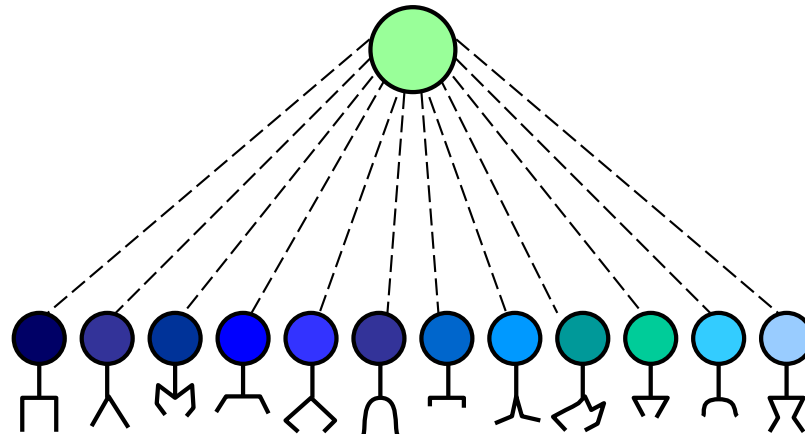
I timociti durante il processo di differenziamento

- Migrano
- Contattano le cellule stromali
- Cambiano fenotipo
- **Esprimono un recettore per l'antigene**
- Subiscono un processo di selezione

Stage 3:

LA GENERAZIONE DELLE DIVERSITA' DEI RECETTORI PER L'ANTIGENE

ORGANI LINFATICI
PRIMARI: GENERAZIONE
DELLE DIVERSITA'



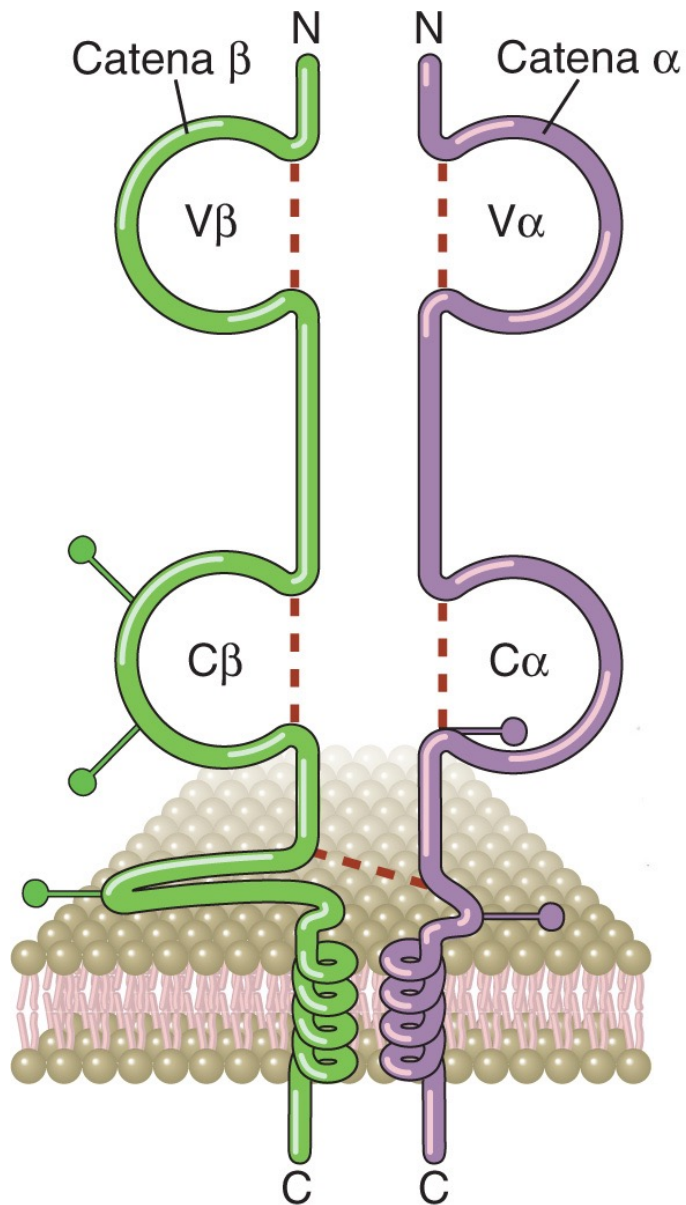
PRECURSORE STAMINALE

GENERAZIONE "CASUALE" DI UN
VASTO REPERTORIO DI RECETTORI
DI MEMBRANA TRA LORO DIVERSI

I meccanismi con cui si genera il repertorio dei TCR sono analoghi a quelli che generano il repertorio degli anticorpi.

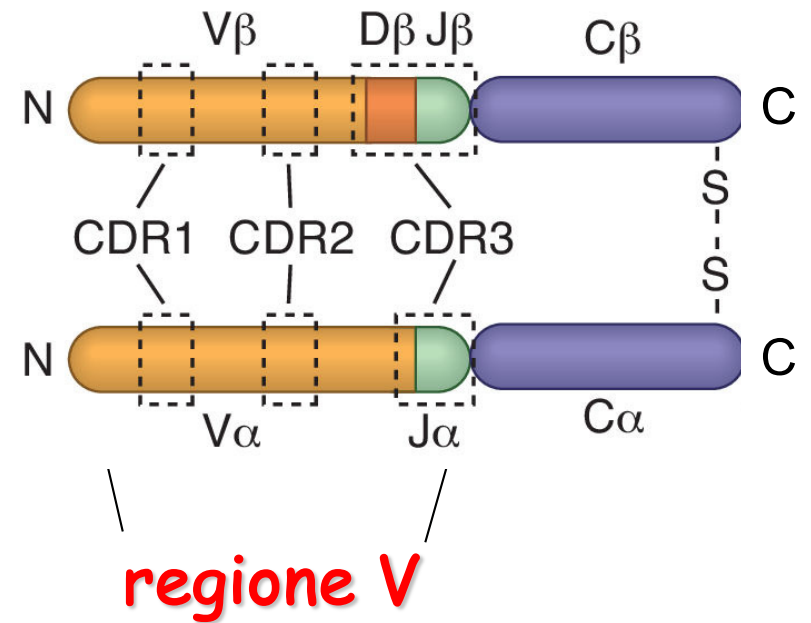
In entrambi i casi le catene polipeptidiche sono codificate da più segmenti genici situati sullo stesso cromosoma, che per divenire geni funzionali devono subire eventi di ricombinazione.

OGNI CATENA POLIPEPTIDICA DEL TCR E' CODIFICATA DA PIU' SEGMENTI GENICI!



Catena β
del TCR

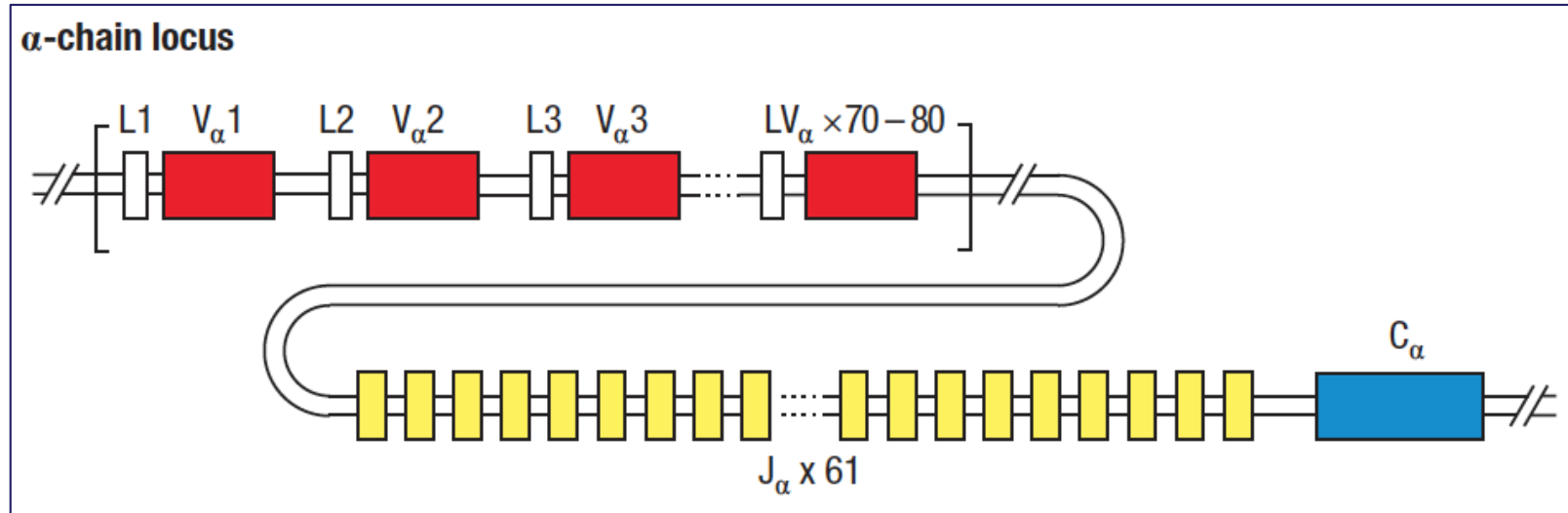
Catena α
del TCR



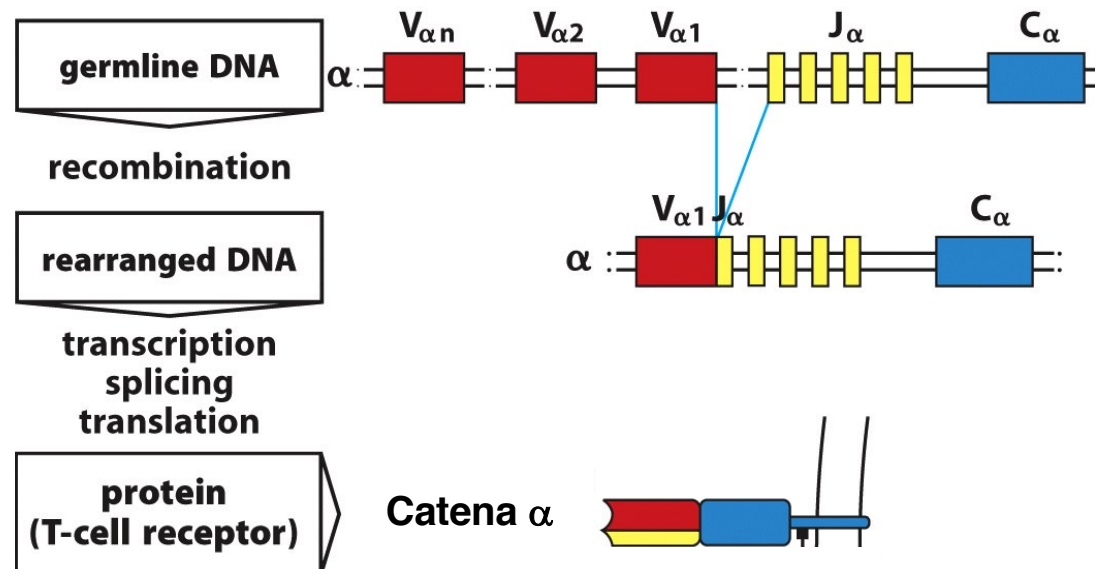
La **regione V** è codificata da tre diversi segmenti genici:

- V** = Variabilità
- D** = Diversità
- J** = Giunzione

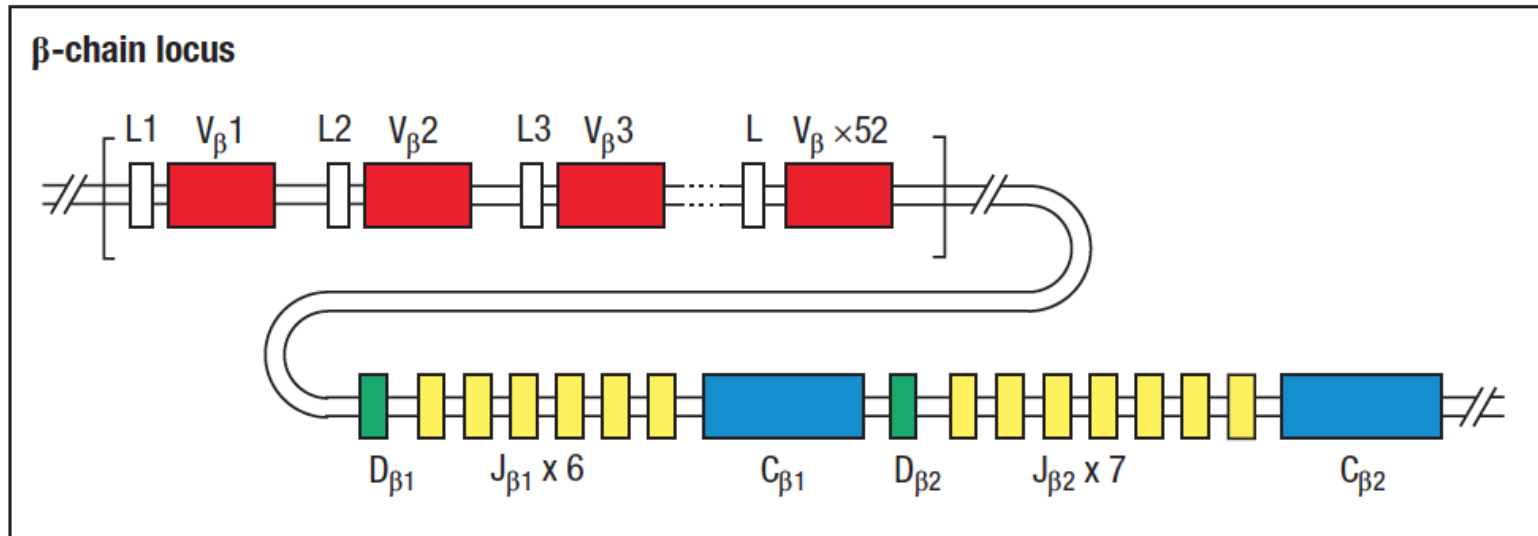
ORGANIZZAZIONE GENOMICA DEL LOCUS α DEL TCR (1000 kb; cromosoma 14)



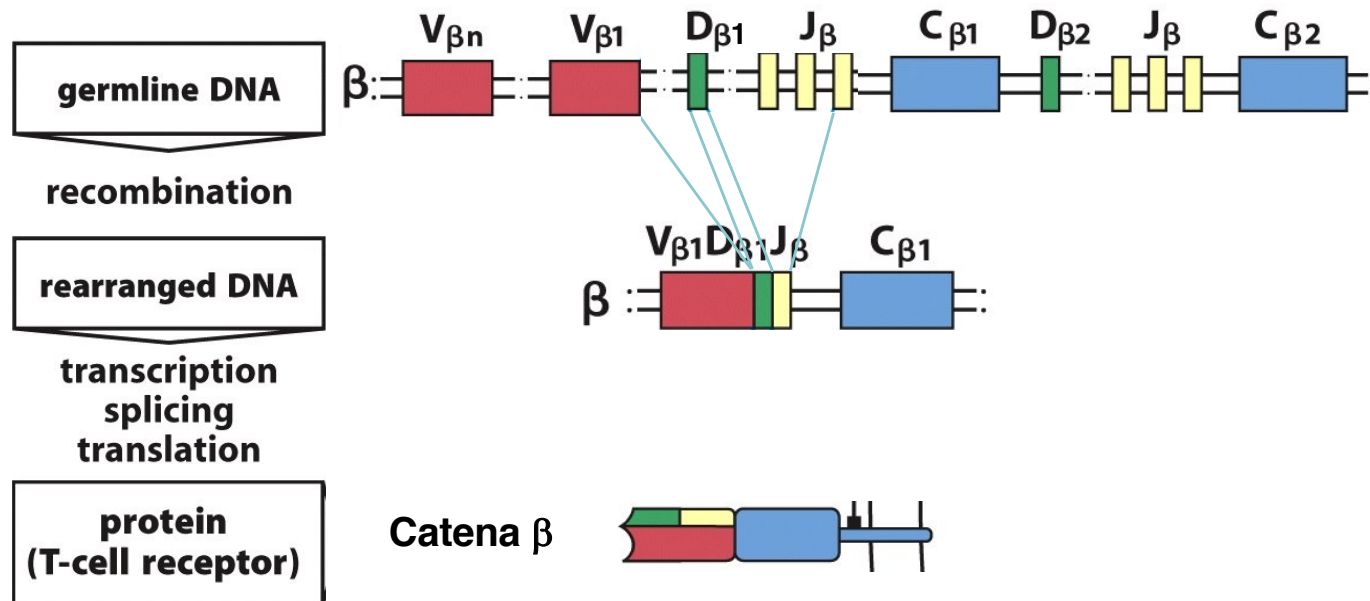
Eventi di ricombinazione V-J permettono la formazione di un gene funzionale per la regione variabile della catena α



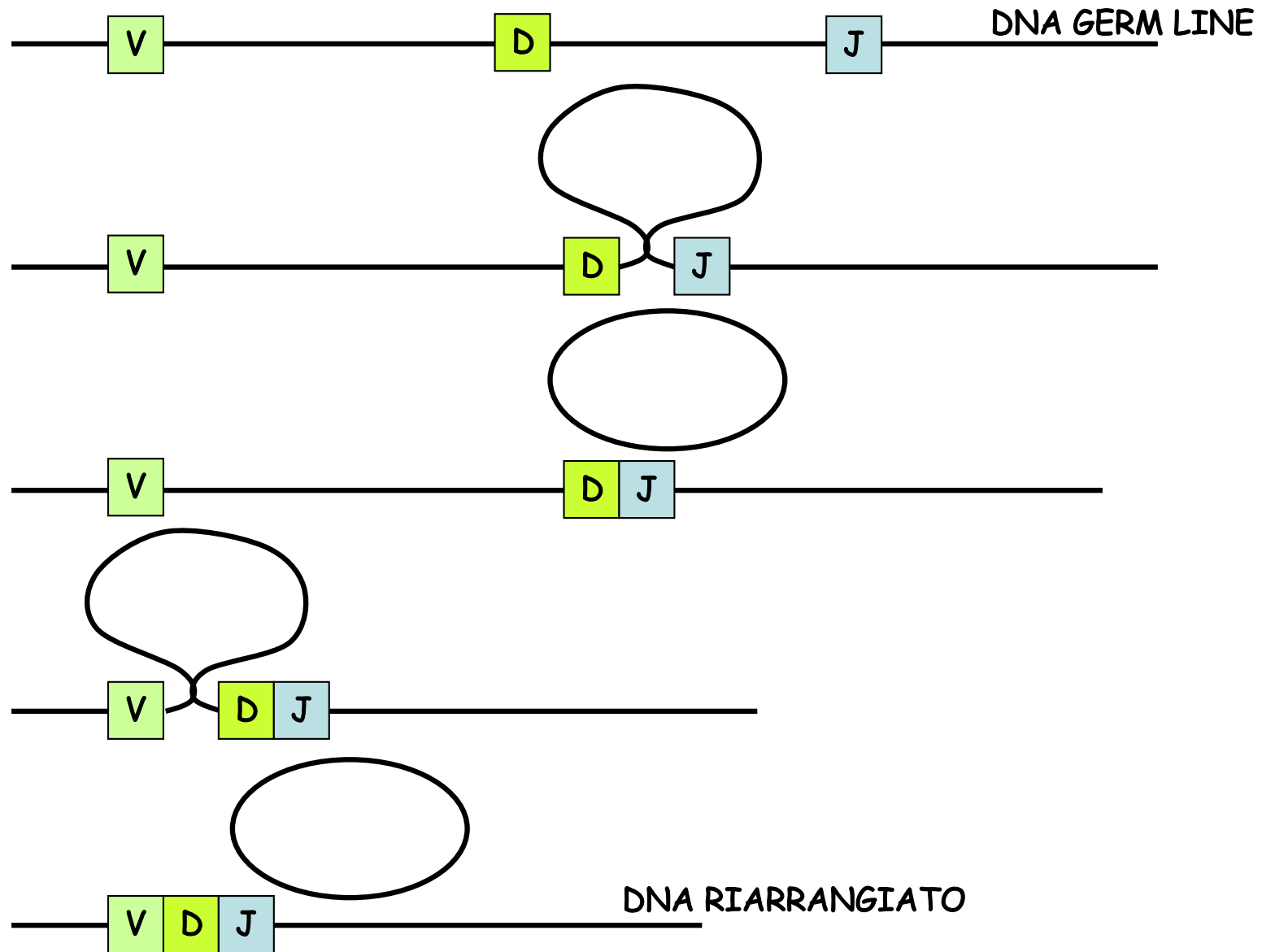
ORGANIZZAZIONE GENOMICA DEI LOCUS β DEL TCR (620 Kb; cromosoma 7)



Eventi di ricombinazione V-D-J permettono la formazione di un gene funzionale per la regione variabile della catena β



I primi eventi di ricombinazione avvengono a livello dei segmenti genici V-D-J che codificano per la regione variabile della catena β

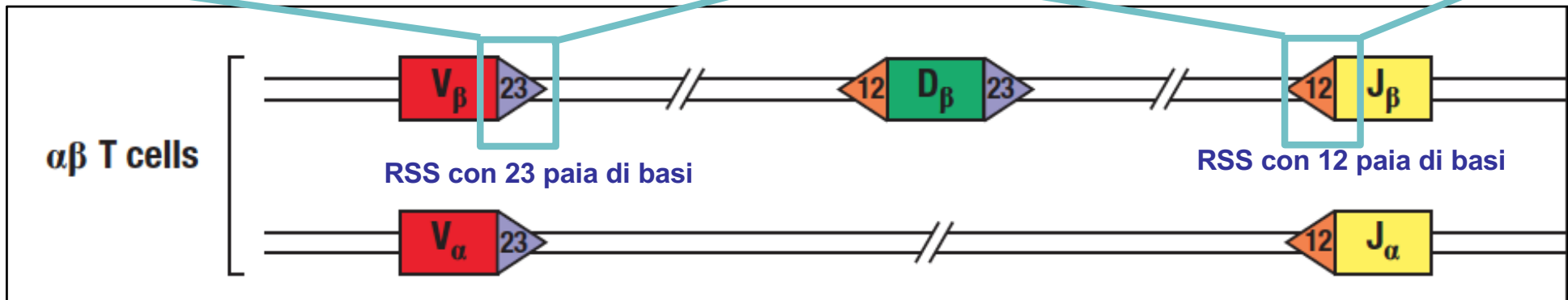
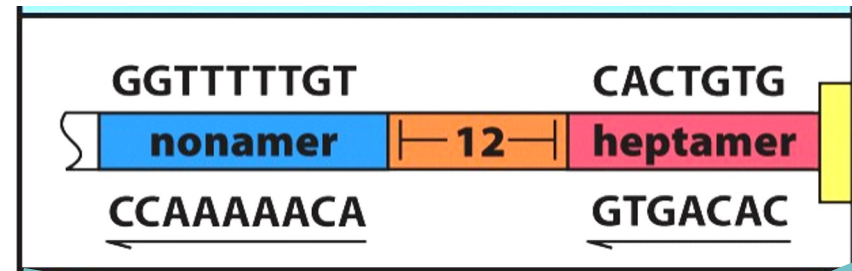
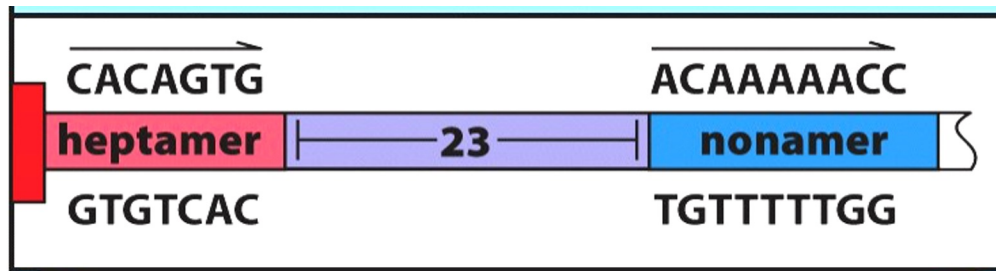


La ricombinazione è promossa dagli enzimi **RAG** (Geni Attivanti la Ricombinazione) o ricombinasi VDJ

I singoli segmenti genici V, D e J sono fiancheggiati da

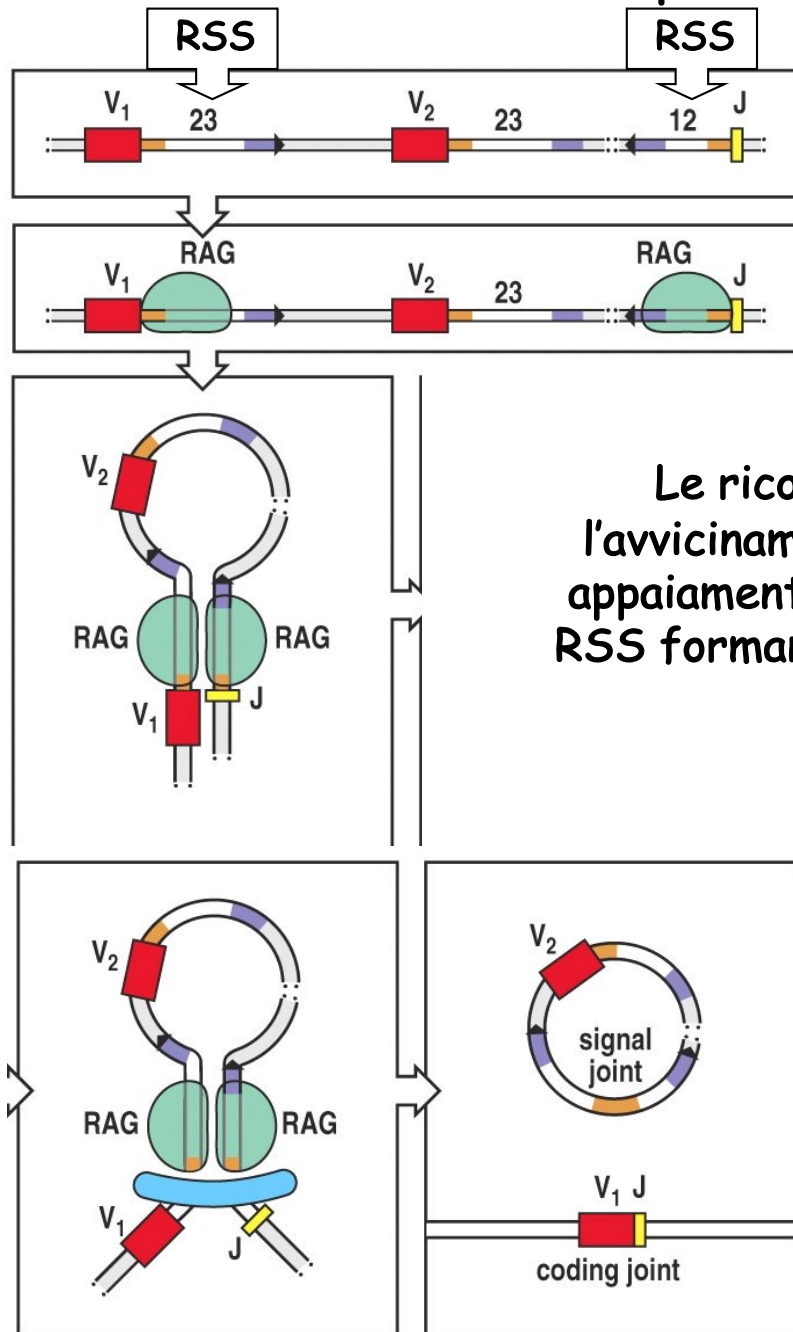
SEQUENZE SEGNALI DI RICOMBINAZIONE (RSS)

RSS = eptamero, sequenza spaziatrice e nonamero



La regola di giunzione 12/23 assicura che il riarrangiamento V-D-J avvenga in maniera corretta

Le ricombinasi **RAG1/RAG2** riconoscono le sequenze RSS e promuovono il riarrangiamento



Le ricombinasi **RAG** promuovono l'avvicinamento dei geni scelti mediante appaiamento delle regioni omologhe delle RSS formando un'ansa di DNA intercalata tra esse

quest'ansa viene poi recisa per azione degli enzimi RAG dotati di attività endonucleasica.....

...e le estremità dei geni VJ vengono saldate ad opera di ligasi

Fattori che contribuiscono alla diversità del TCR

DIVERSITA' COMBINATORIALE

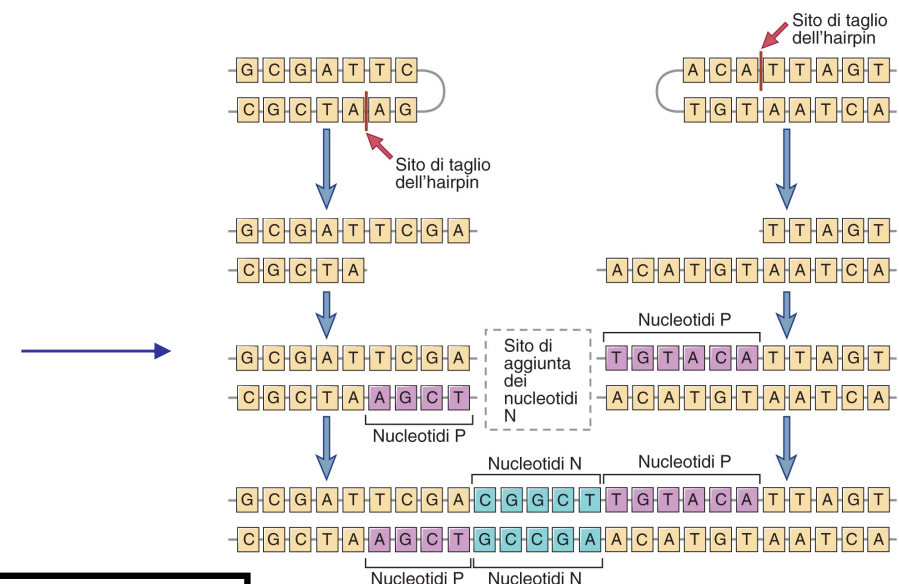
- Geni multipli per la regione variabile V, D, J
(scelta casuale di uno solo dei segmenti V, D e J)
- Associazione combinatoriale delle catene α e β

Elemento	Recettore α - β	
	β	α
Segmenti variabili (V)	52	~70
Segmenti di diversità (D)	2	0
Segmenti di giunzione (J)	13	61
Numero di coppie di geni V	$5,8 \times 10^6$	

DIVERSITA' GIUNZIONALE

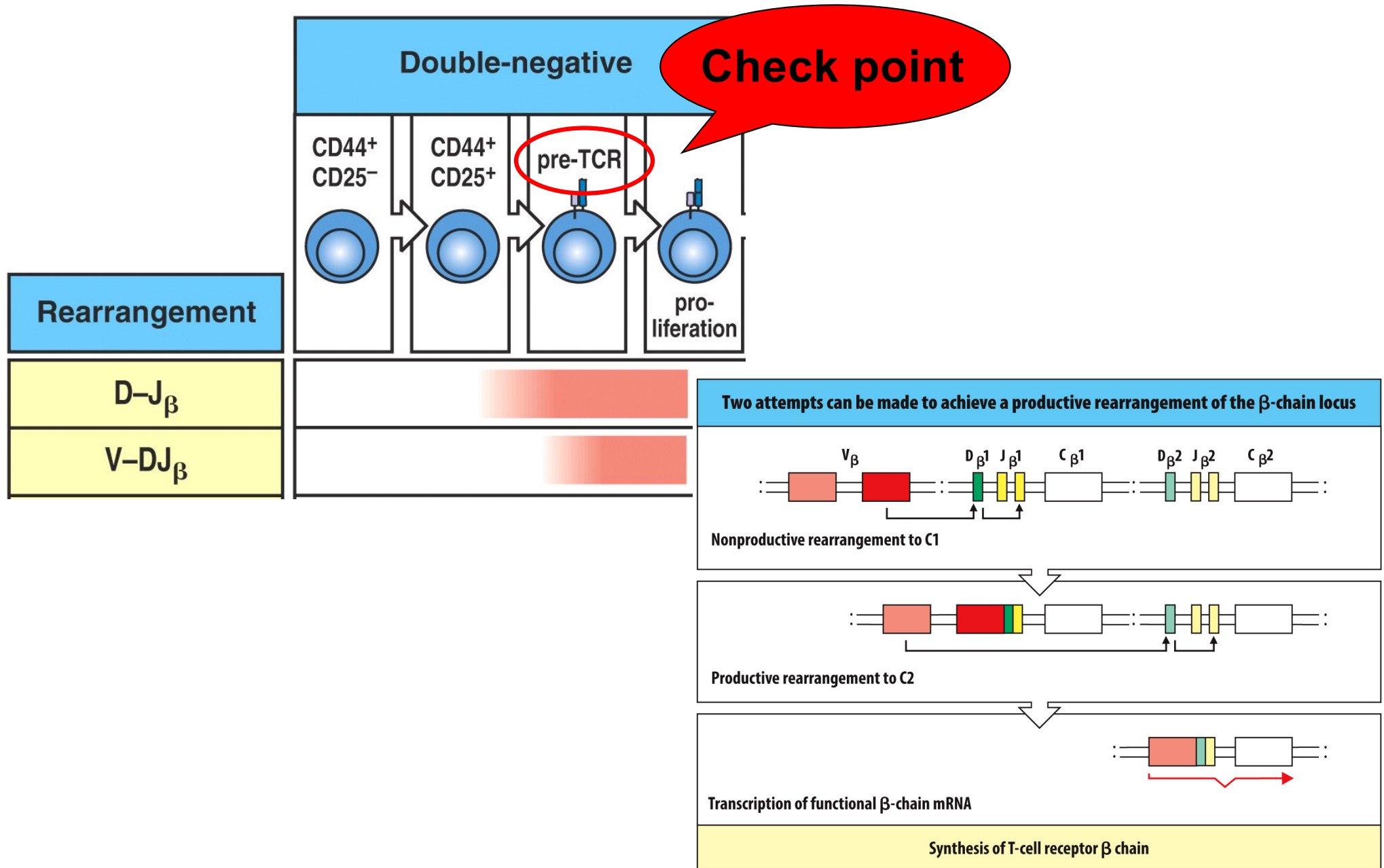
- Rimozione o aggiunta di nucleotidi nel punto di giunzione

Aggiunta di nucleotidi P e di nucleotidi N ad opera della terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)

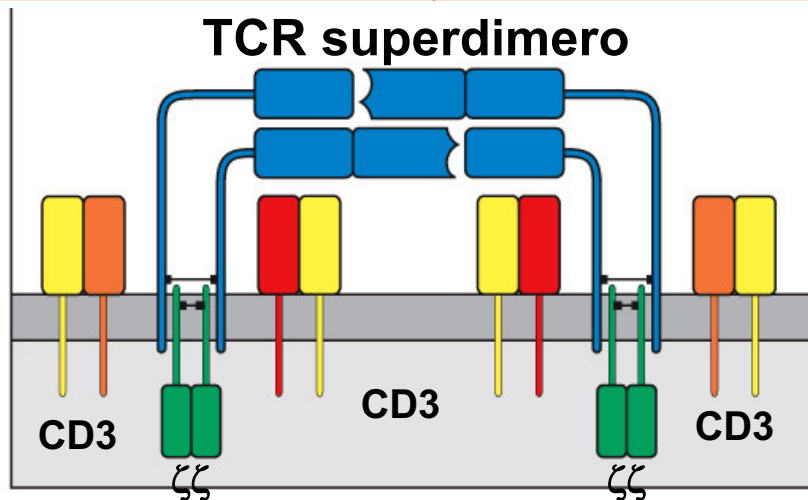
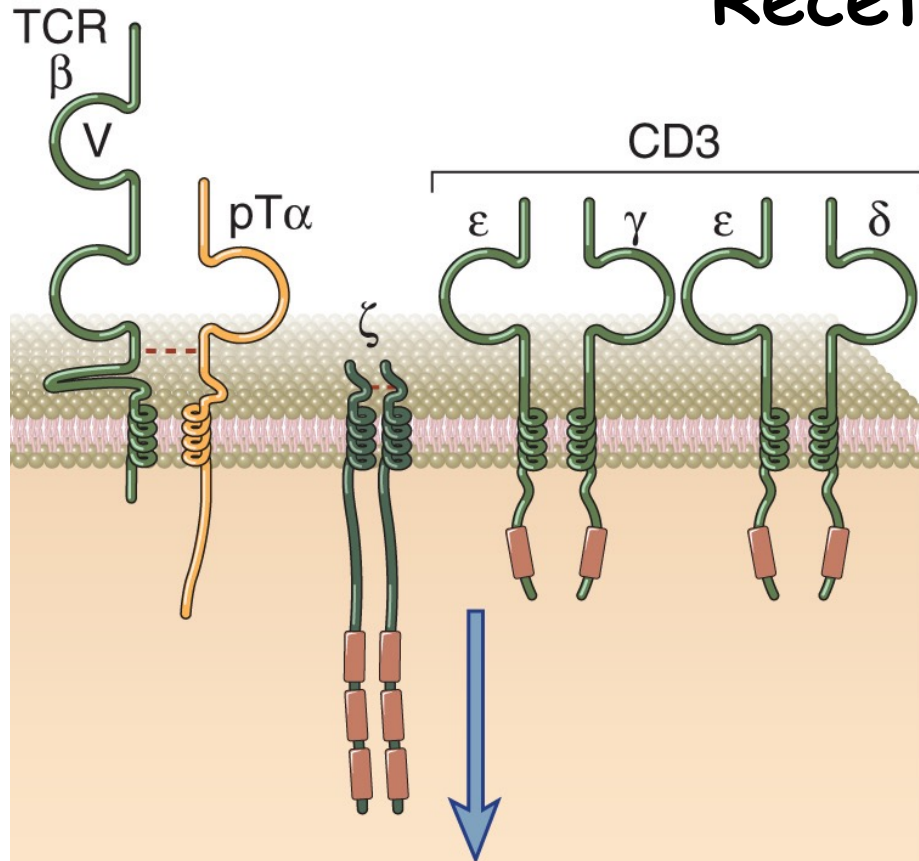


$\sim 10^{16}$ recettori diversi

Correlazione tra gli stadi di sviluppo dei linfociti T ed il riarrangiamento dei geni per la catena beta del TCR

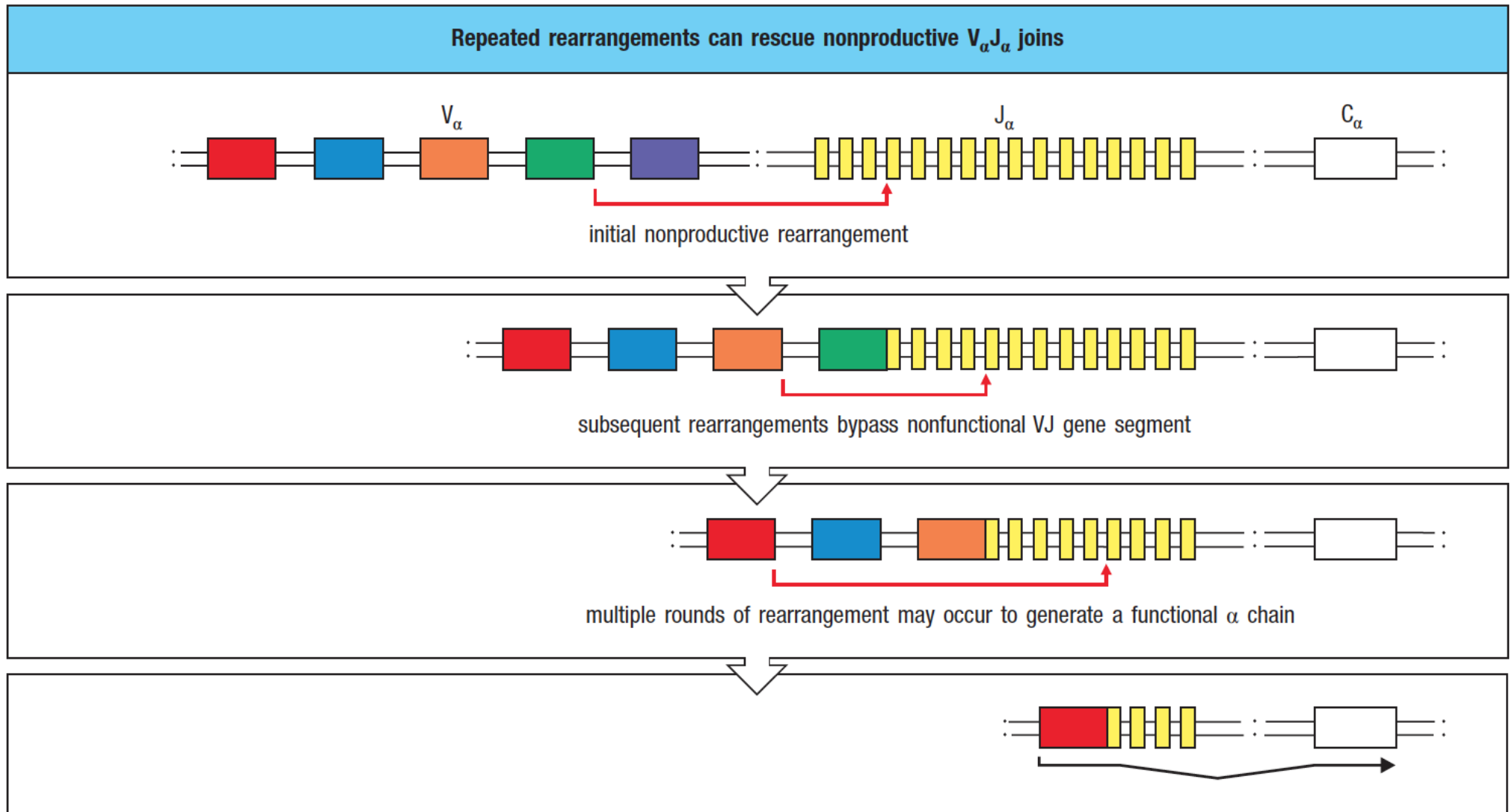


Recettore pre-T

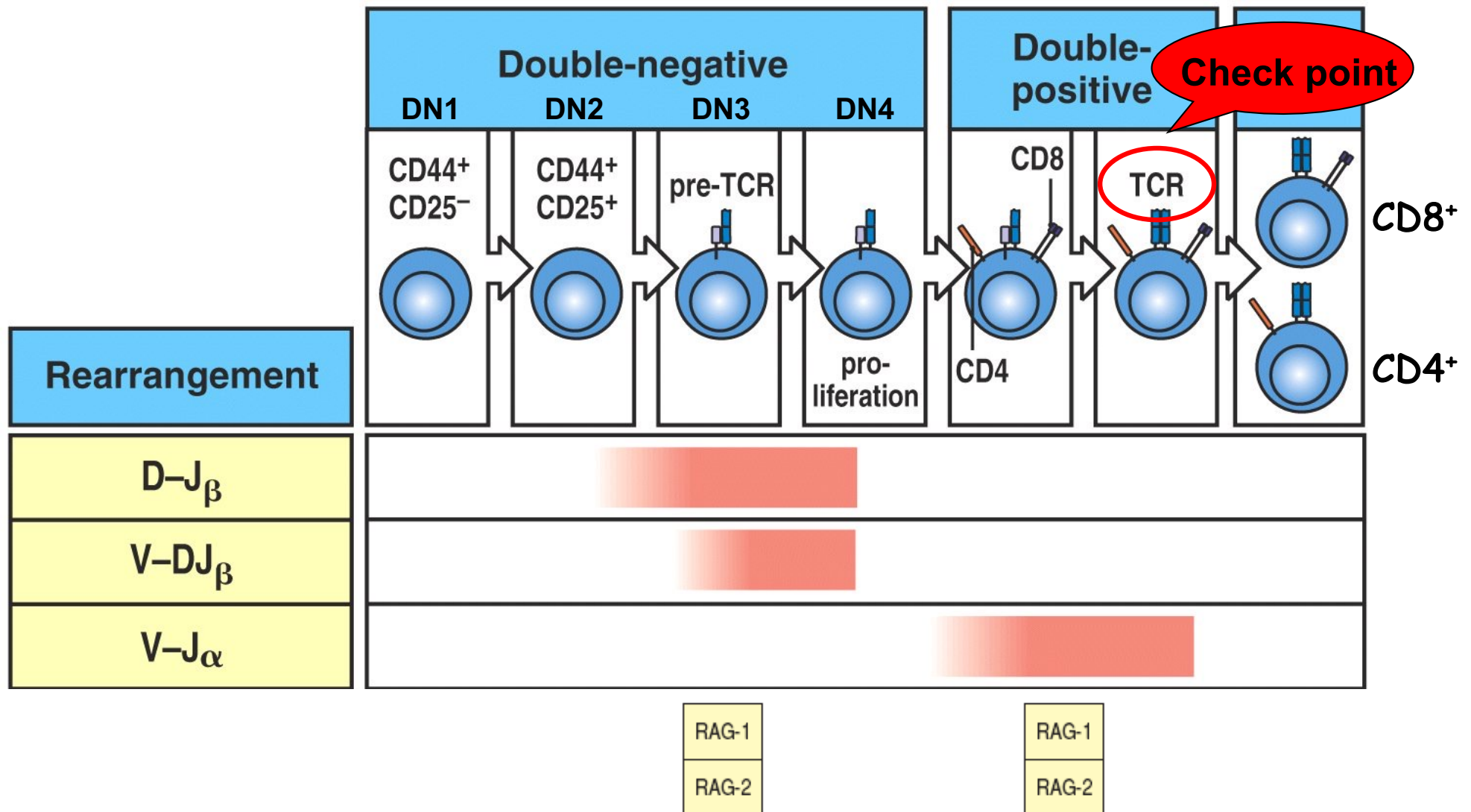


- Inibizione della ricombinazione del gene della catena β **Esclusione allelica**
- Sopravvivenza e proliferazione delle cellule pre-T
- Espressione di CD4 e CD8
- Riarrangiamento del locus α

Eventi di riarrangiamento $V\alpha$ e $J\alpha$ si susseguono fino a garantire un evento produttivo



Correlazione tra gli stadi di sviluppo dei linfociti T ed il riarrangiamento dei geni per il recettore TCR



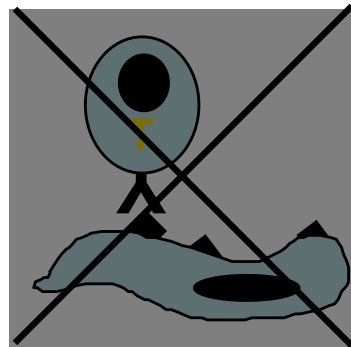
I timociti durante il processo di differenziamento

- Migrano
- Contattano le cellule stromali
- Cambiano fenotipo
- Esprimono un recettore per l'antigene
- **Subiscono un processo di selezione**

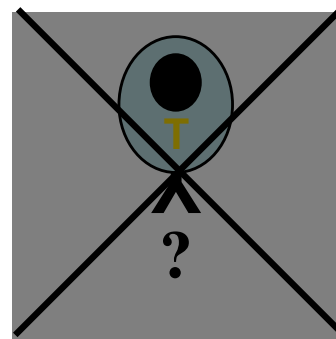
SELEZIONE TIMICA

La selezione timica ha come finalità:

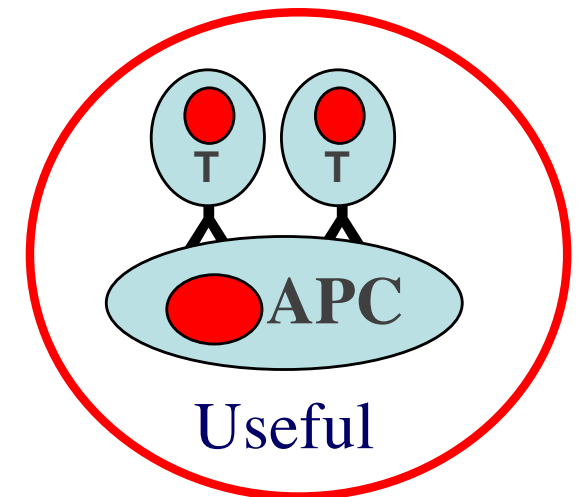
- Eliminare i timociti inutili (perché incapaci di riconoscere molecole MHC self) e i timociti potenzialmente pericolosi (perché capaci di riconoscere ad alta avidità complessi MHC self-peptide self e quindi di indurre reazioni autoimmuni)



Harmful



Useless



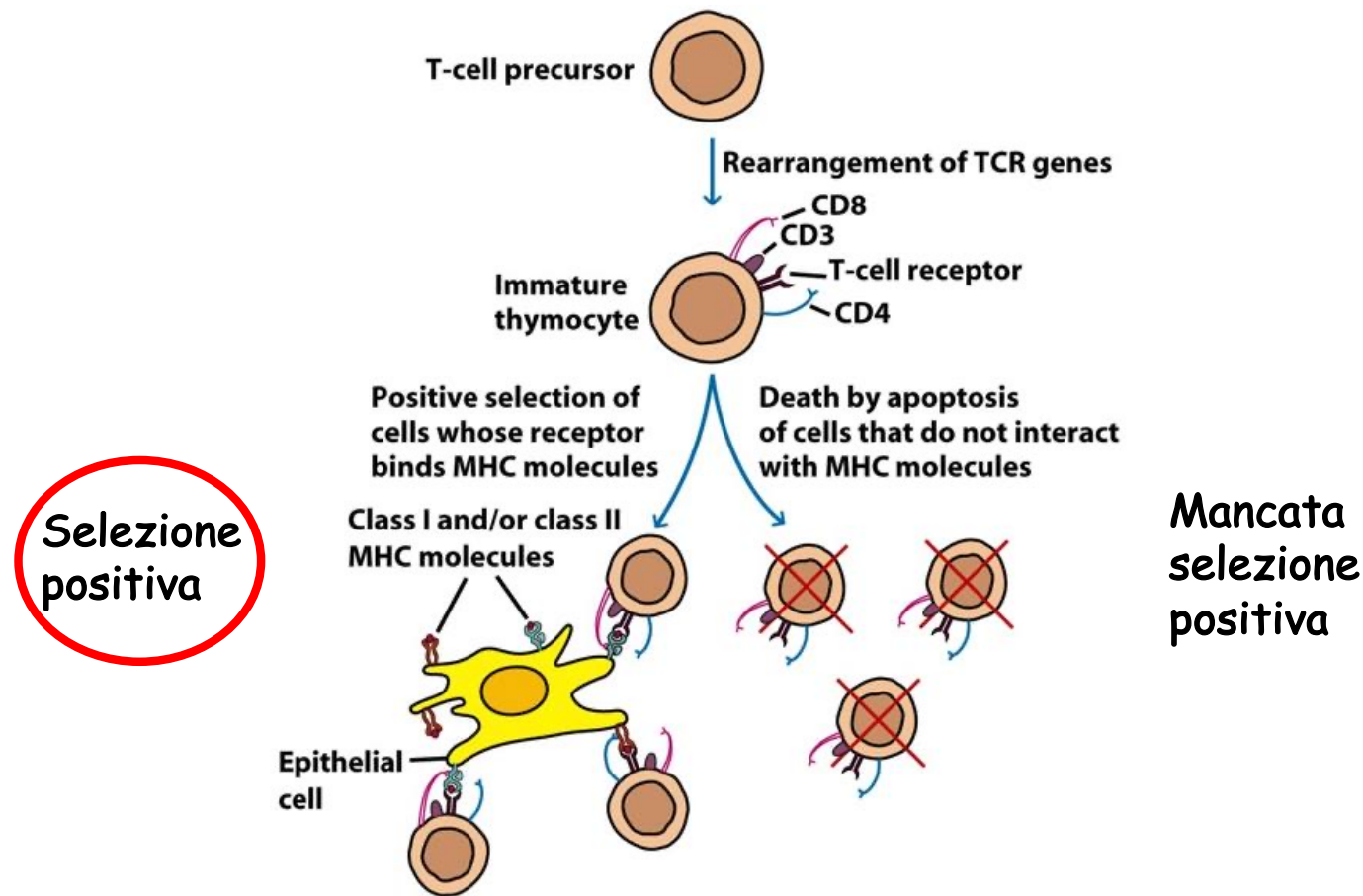
Useful

- **Mantenere i timociti con specificità utili**

- Selezione positiva

Avviene a livello dei timociti doppi positivi ($CD4^+/CD8^+$)

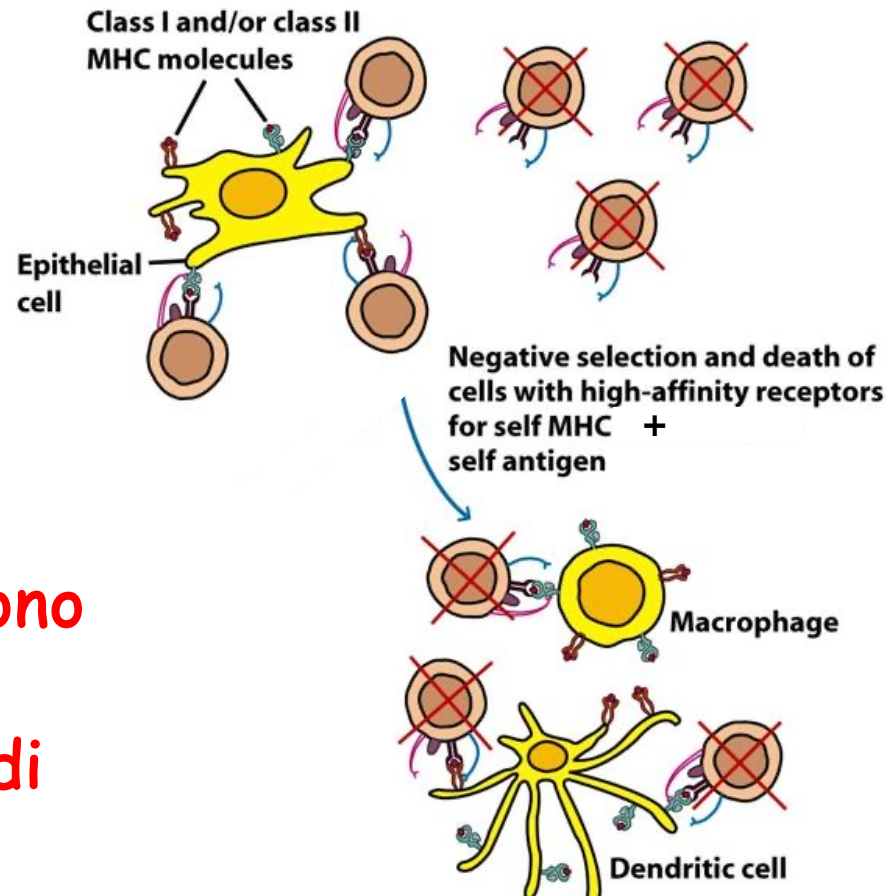
Maturano solo quei timociti il cui TCR è in grado di riconoscere molecole MHC self



I timociti sopravvissuti sono ristretti per molecole MHC self

- Selezione negativa

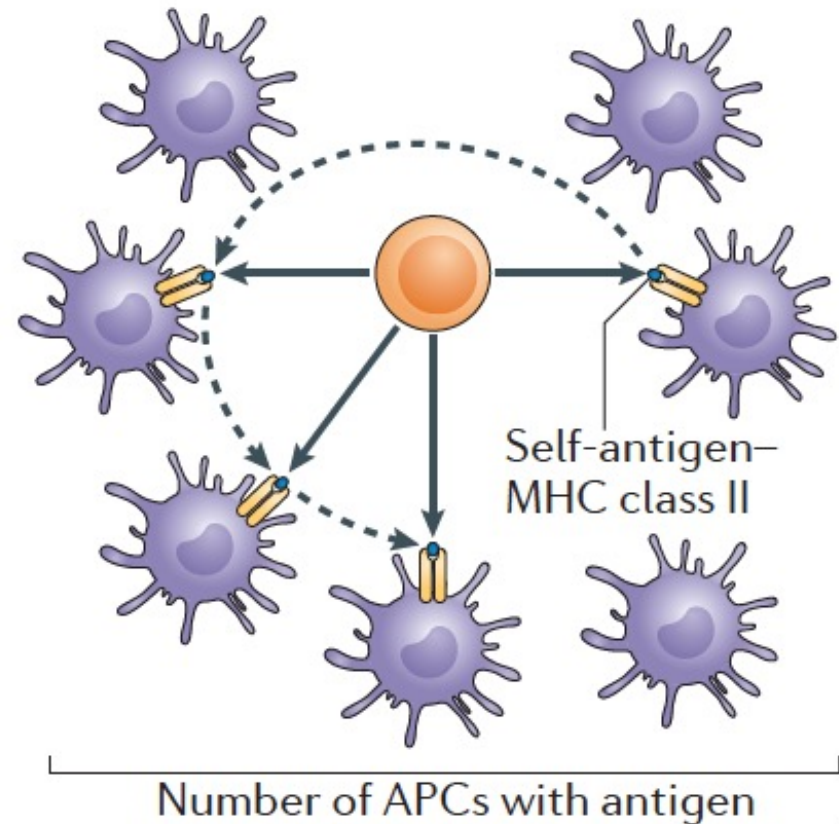
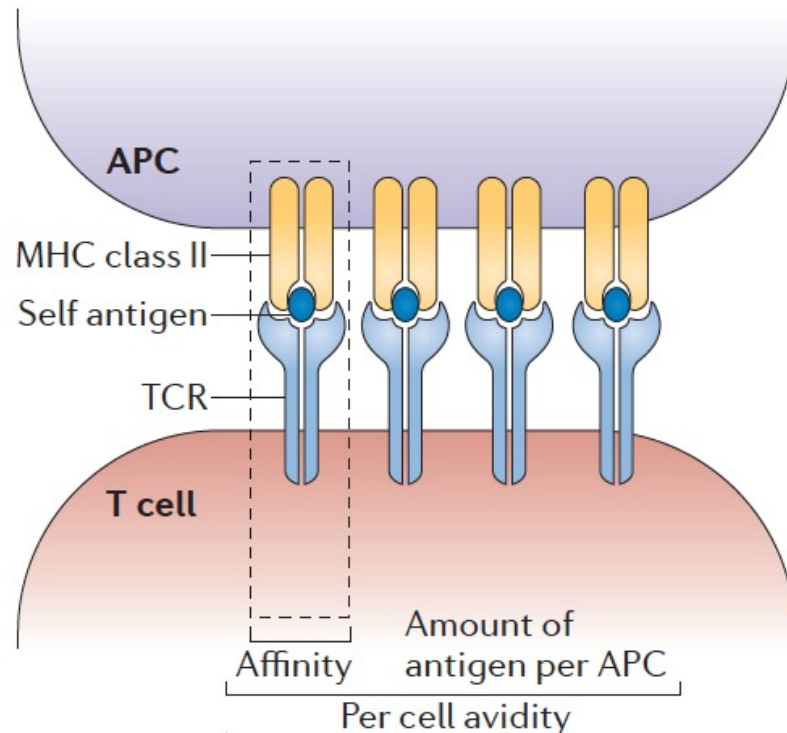
- Avviene a livello dei timociti doppi positivi ($CD4^+/CD8^+$)
- Rimuove quei timociti il cui TCR è in grado di riconoscere peptidi self complessati a molecole MHC self ad affinità elevata



I timociti sopravvissuti sono tolleranti nei confronti di antigeni self

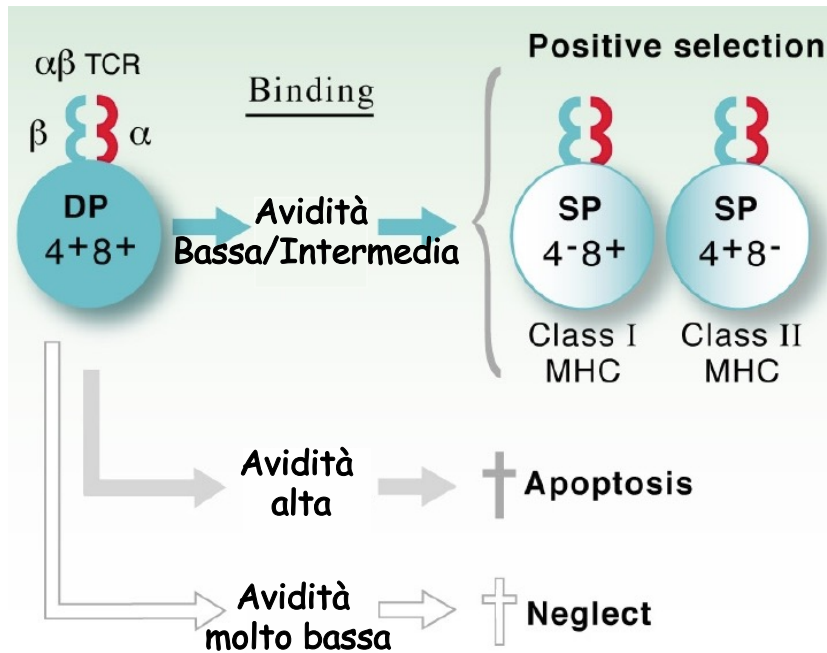
Selezione negativa

Correlazione tra affinità/avidità ...



Avidità { **Affinità** della singola interazione TCR/MHCpeptide
Densità delle interazioni TCR/MHCpeptide/cellula

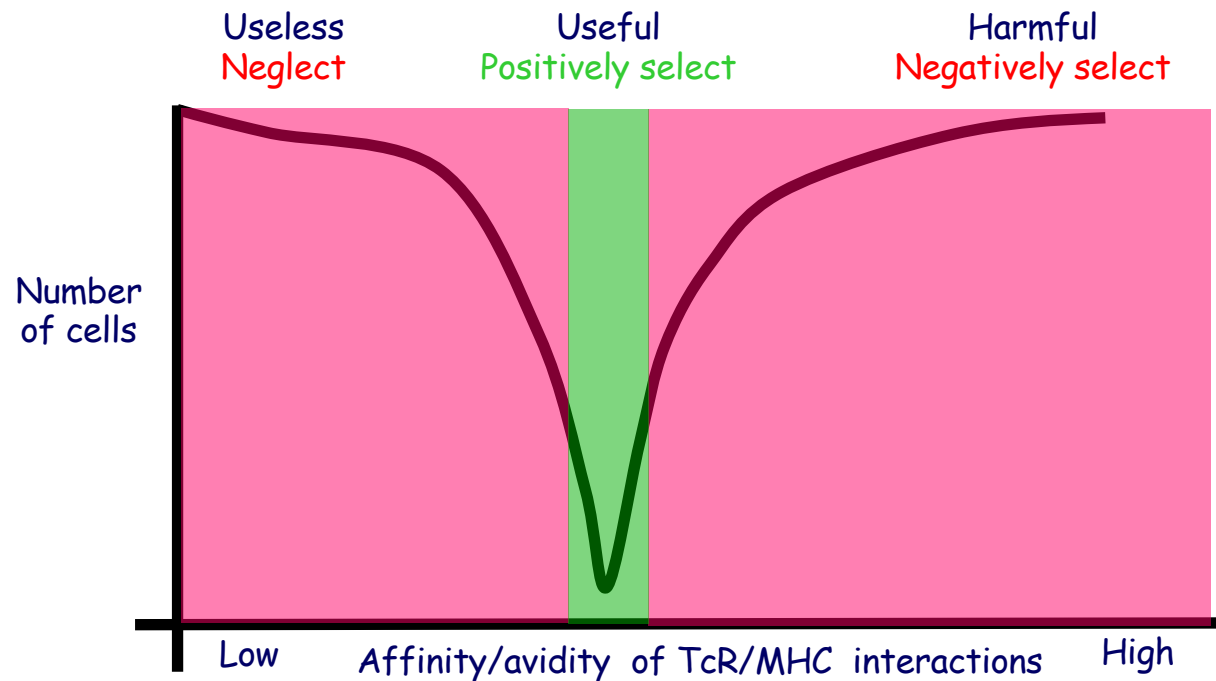
...e selezione basata sulla forza complessiva del segnale



Il linfocita supera la selezione e sopravvive

Il linfocita muore per apoptosi

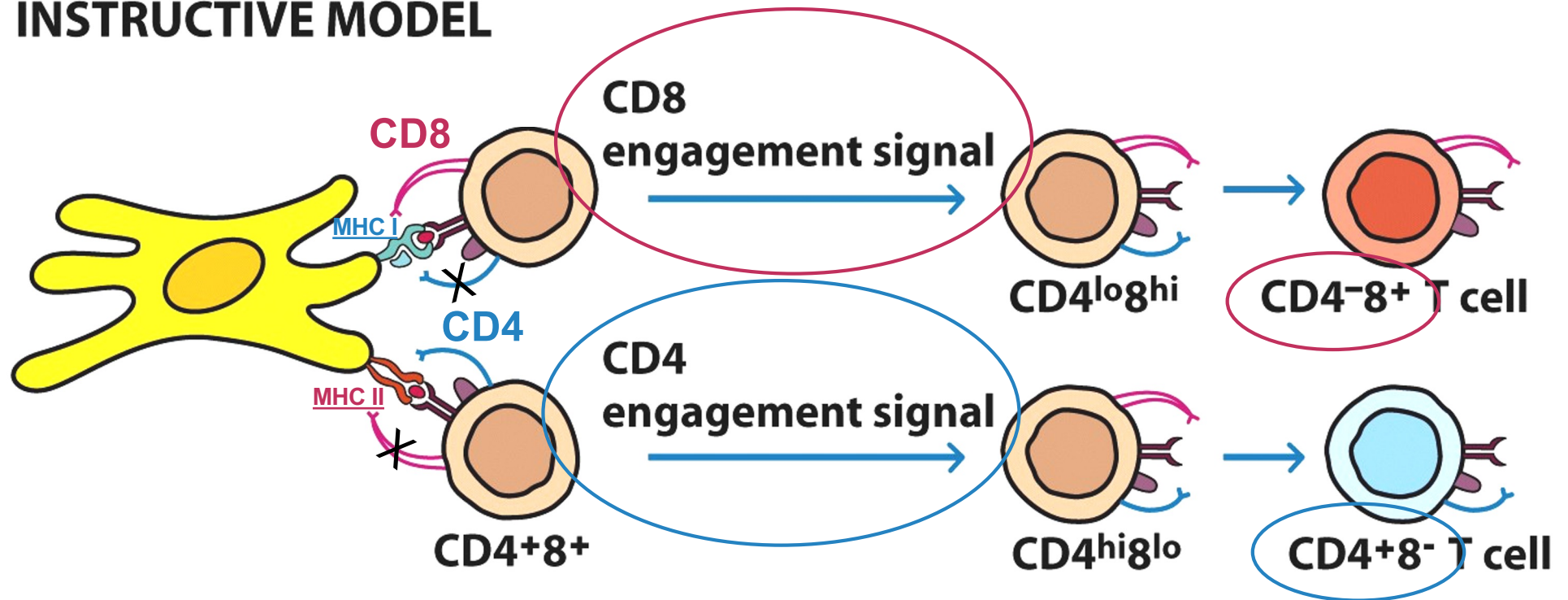
Il linfocita negletto muore di solitudine



CD4 o CD8?

Principale modello proposto per la scelta del corecettore

INSTRUCTIVE MODEL



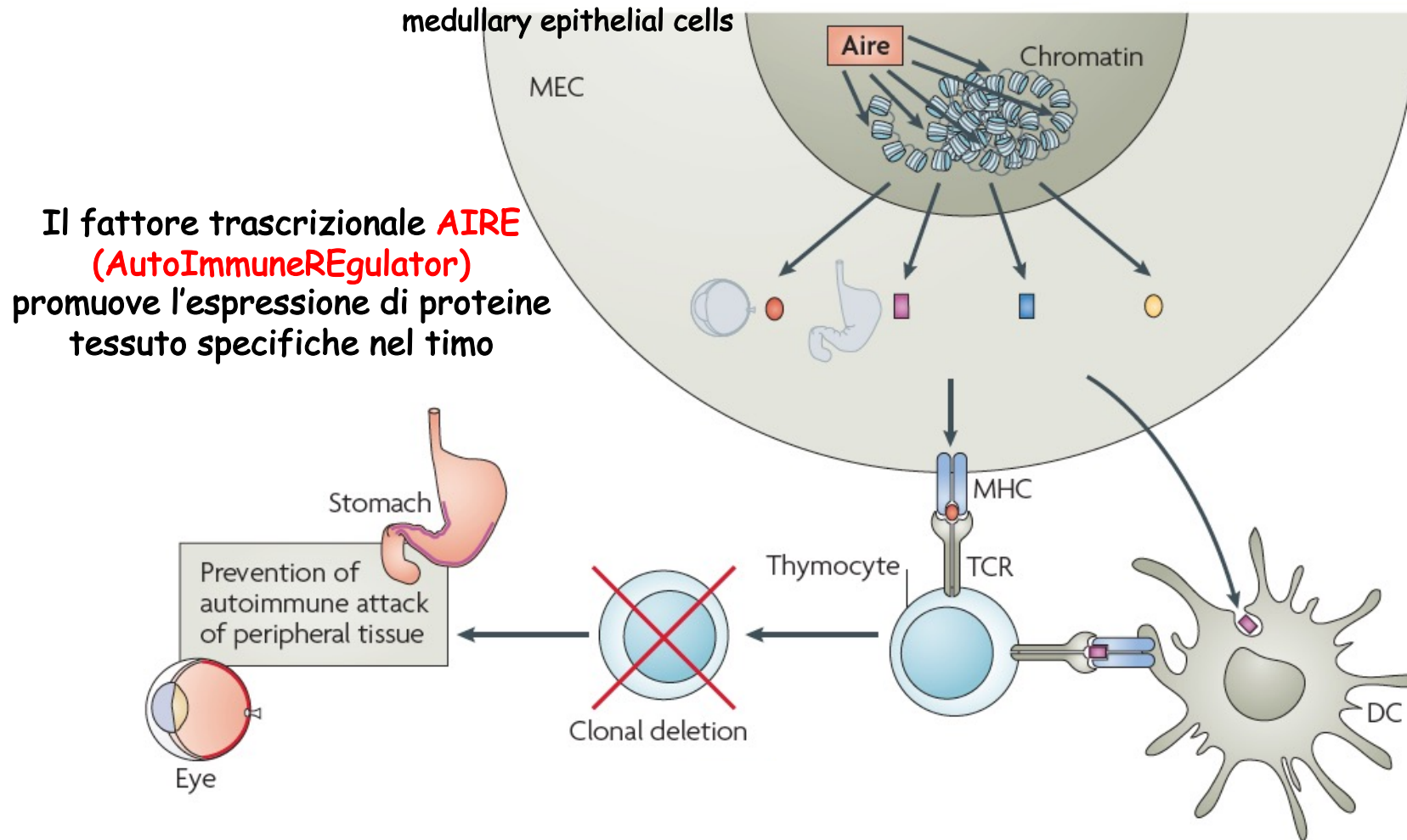
EFFETTO DELLA MANCANZA DI MOLECOLE MHC DI CLASSE I O II SULLA POPOLAZIONE DI TIMOCITI

Tipo cellulare	Topi di controllo	Topi knockout	
		<u>Mancanti di molecole di classe I</u>	<u>Mancanti di molecole di classe II</u>
CD4 ⁻ 8 ⁻	+	+	+
CD4 ⁺ 8 ⁺	+	+	+
CD4 ⁺	+	+	-
CD8 ⁺	+	-	+

How can the thymus express all self antigens - including self antigens only made by specialised tissues?

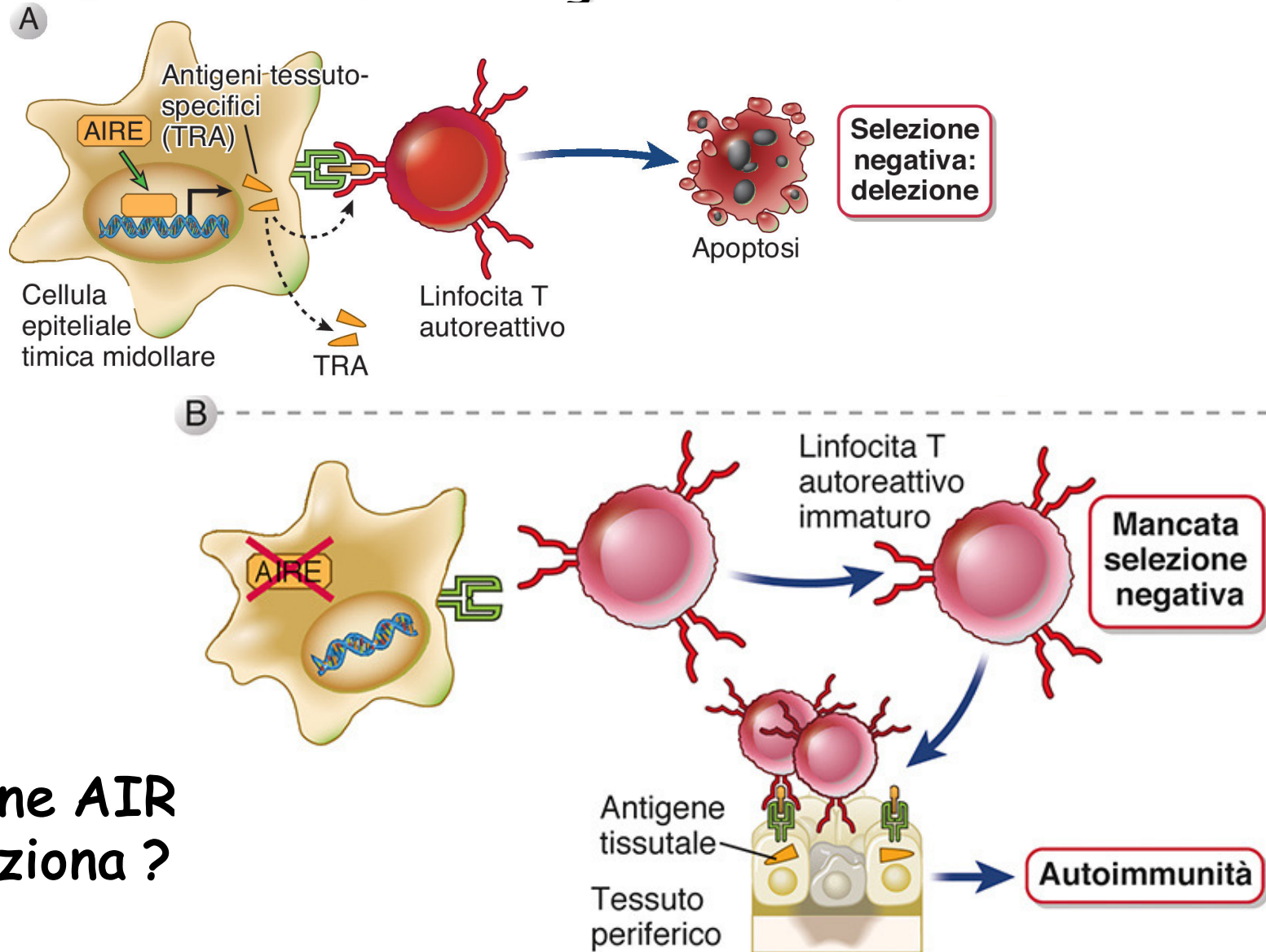
How do we become self tolerant to these antigens?

AIRE: from transcriptional regulation to tolerance induction



TOLLERANZA CENTRALE

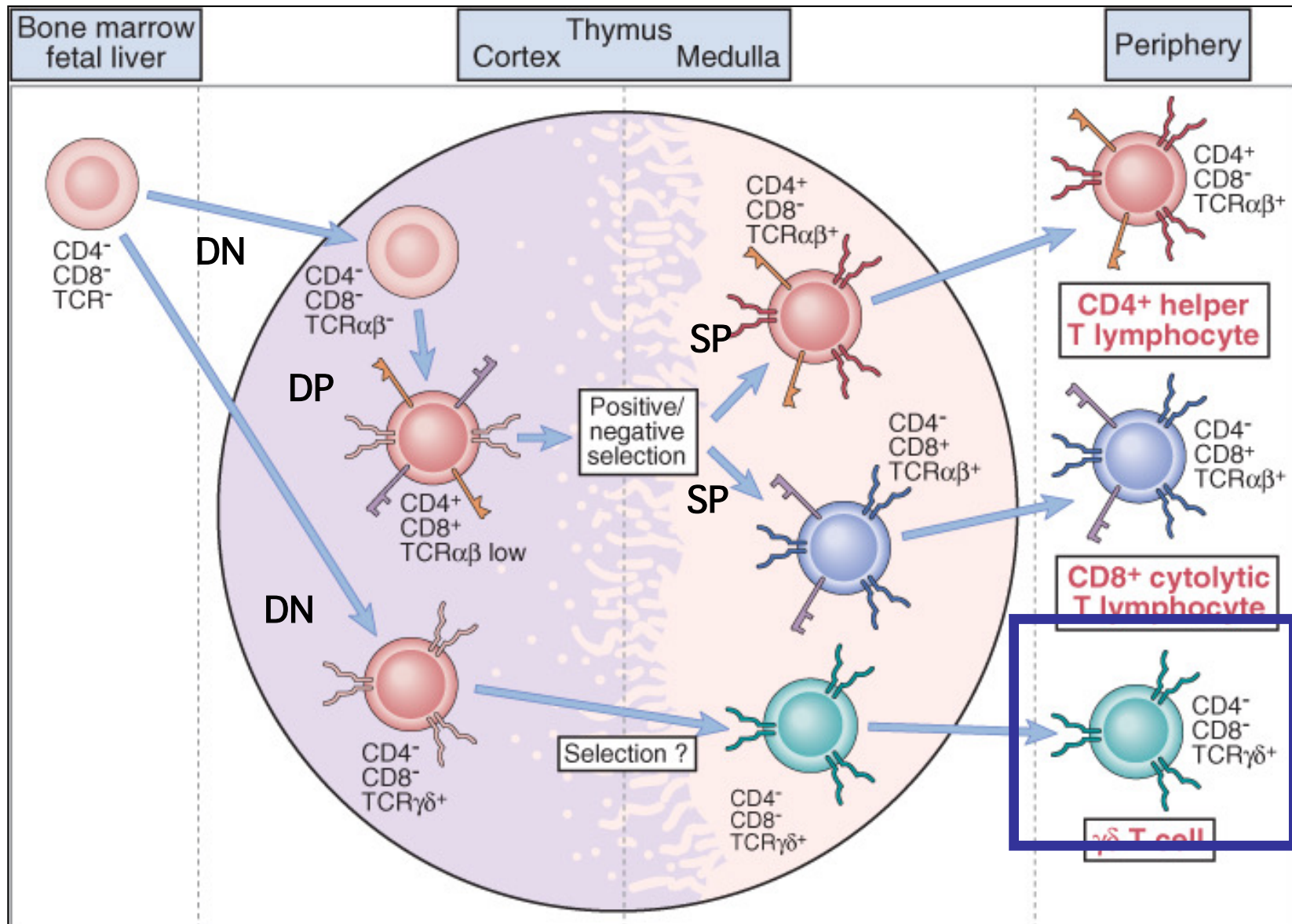
Ruolo di **AIRE** nella selezione negativa dei timociti autoreattivi



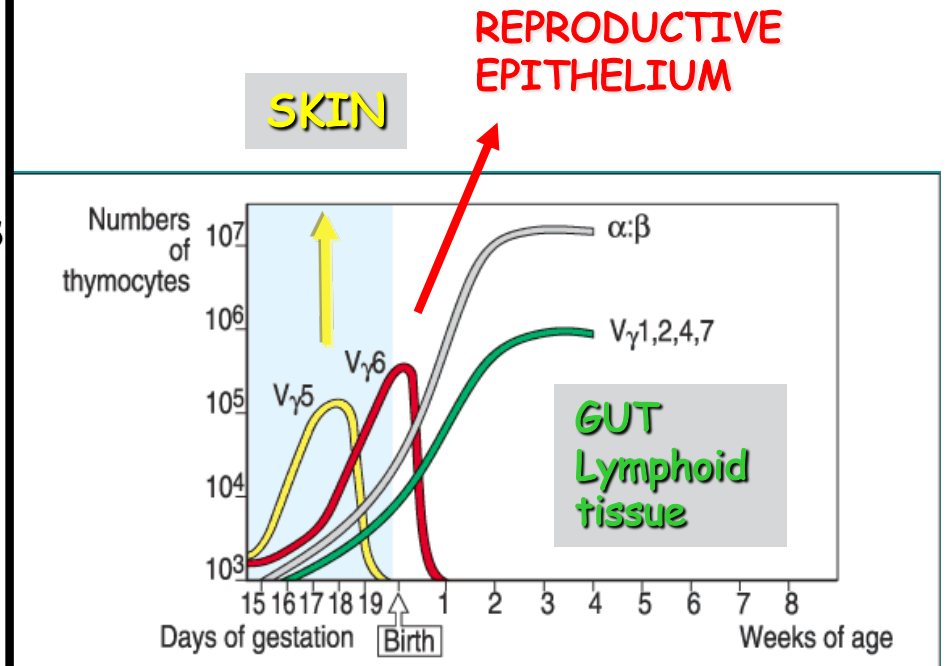
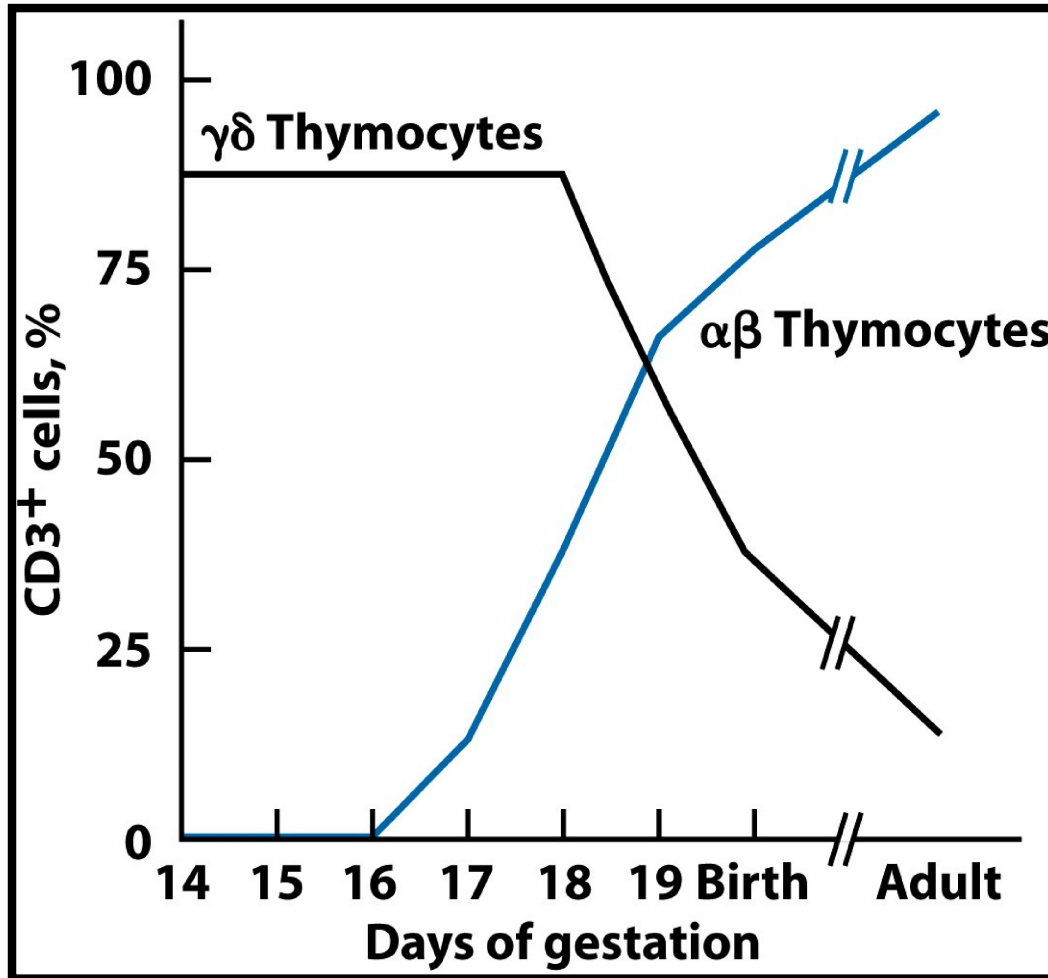
Se il gene AIR non funziona ?

La mancata selezione negativa che ne deriva provoca Risposte autoimmuni contro diversi organi periferici, produzione di autoanticorpi

ONTOGENESI DEI LINFOCITI T



I timociti con TCR di tipo γ/δ sono prodotti principalmente durante la vita fetale



Restricted V_{γ} usage in waves of $\gamma\delta$ T cells

CARATTERISTICHE DELLE DUE POPOLAZIONI DI LINFOCITI T

	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$
Frequenza nel sangue periferico	90% dei linfociti T	10% dei linfociti T
Localizzazione	sangue periferico organi linfoidi	epiteli di rivestimento
Riconoscimento	peptide estraneo + MHC self	MHC non classici? molecole indotte da stress?
Fenotipo	CD4 ⁺ o CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻
Funzione	helper o citotossica	citotossica
Ruolo	risposta adattativa contro antigeni estranei	prima linea di difesa riconoscimento cellule alterate