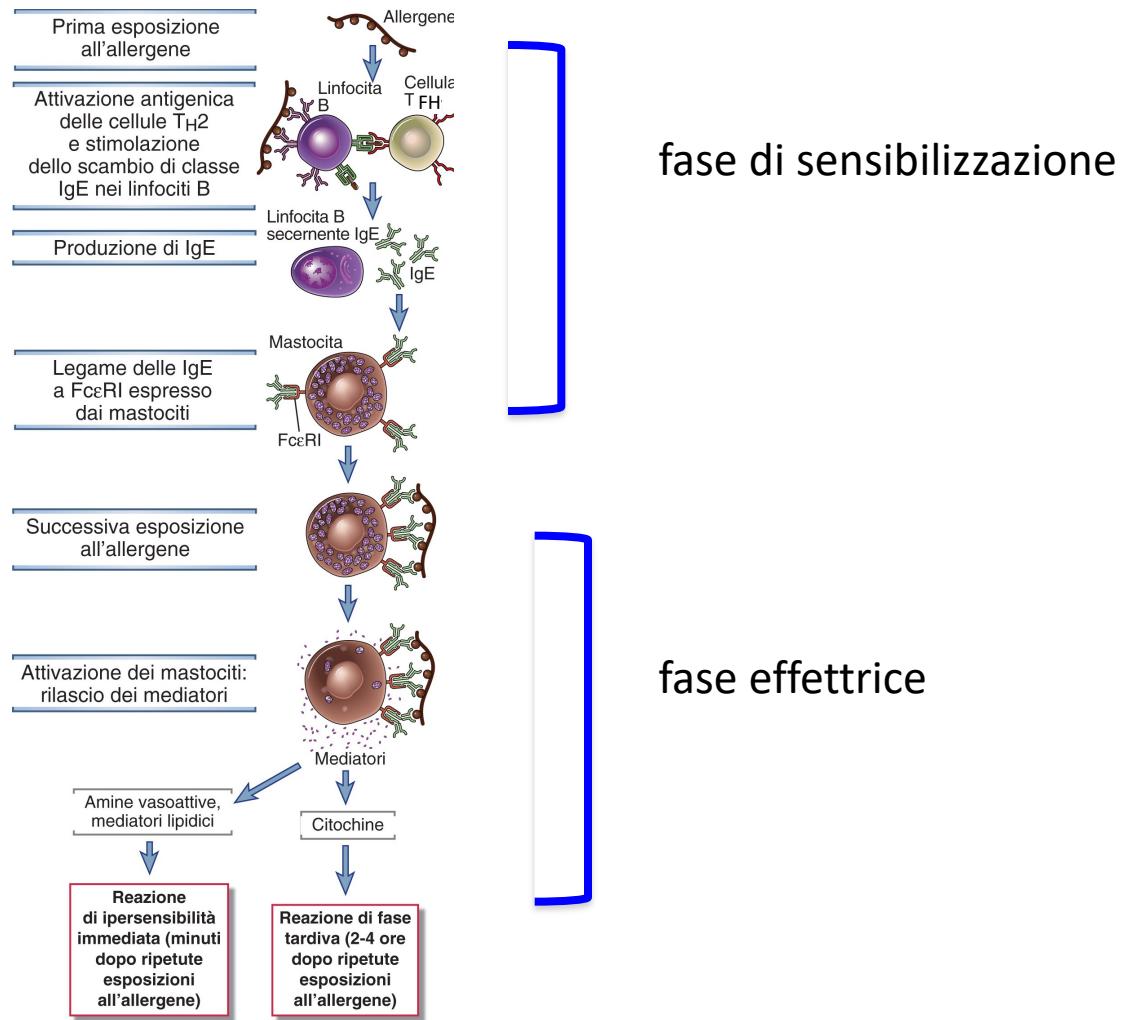
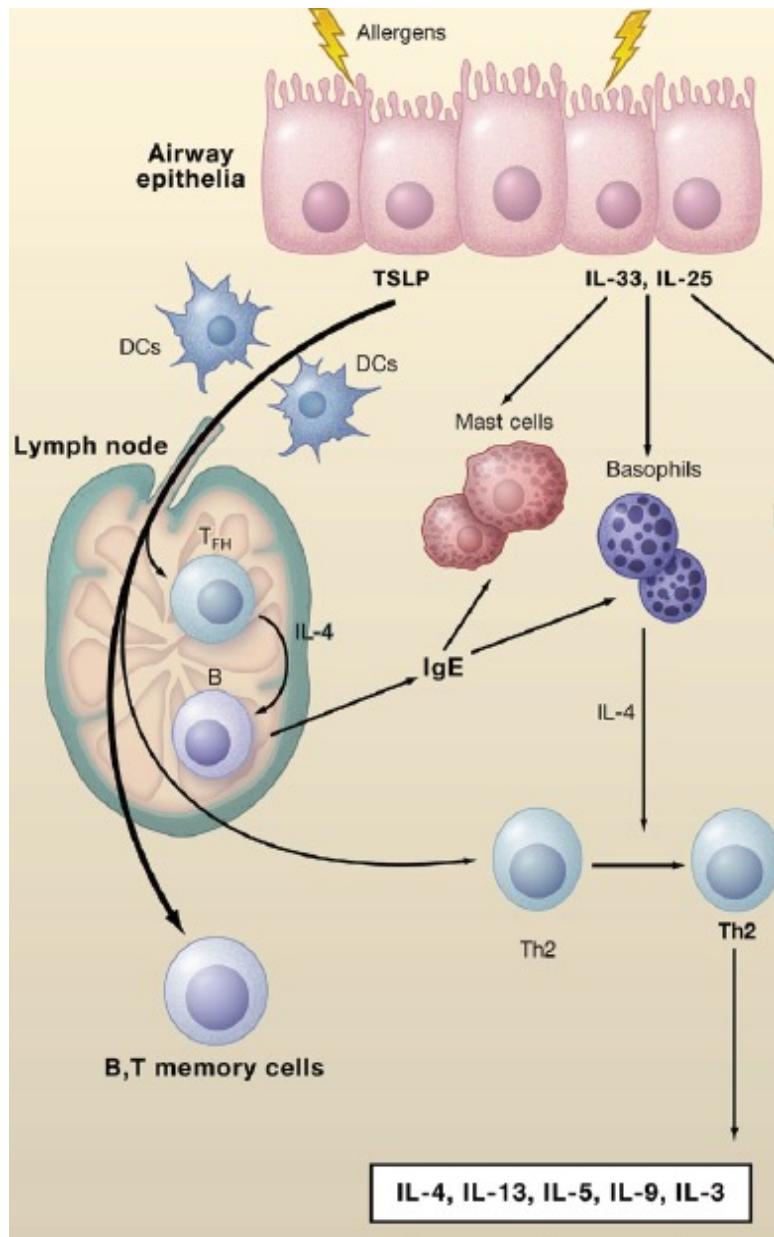


# Tutte le reazioni di ipersensibilità di tipo I sono caratterizzate da una serie di eventi avviati dall'esposizione all'allergene



## Fase di sensibilizzazione



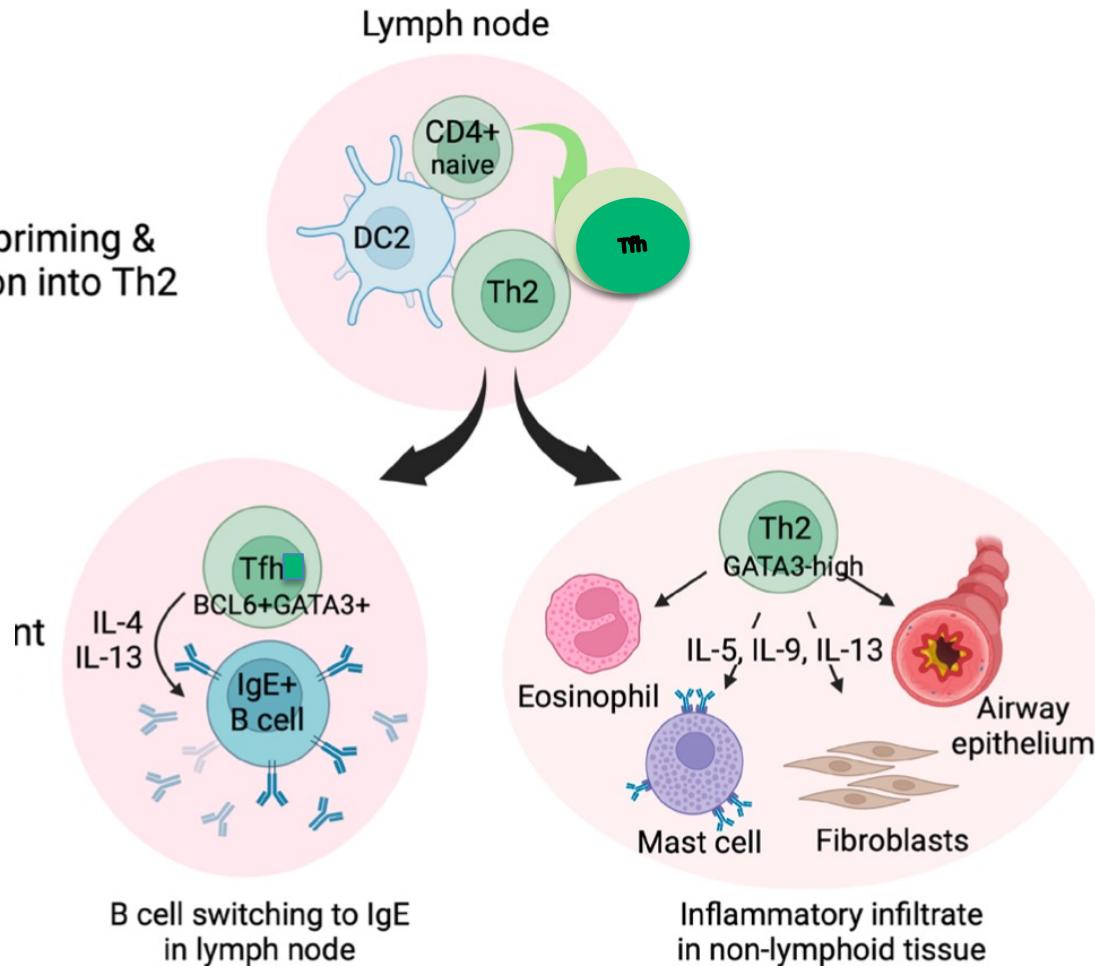
In un soggetto allergico il primo incontro con l'allergene induce una risposta anticorpale o umorale caratterizzata dalla produzione di IgE.

Inoltre sono indotti linfociti T helper 2 che sono caratterizzati dalla produzione di IL-4, IL-5, IL-9, IL-13.

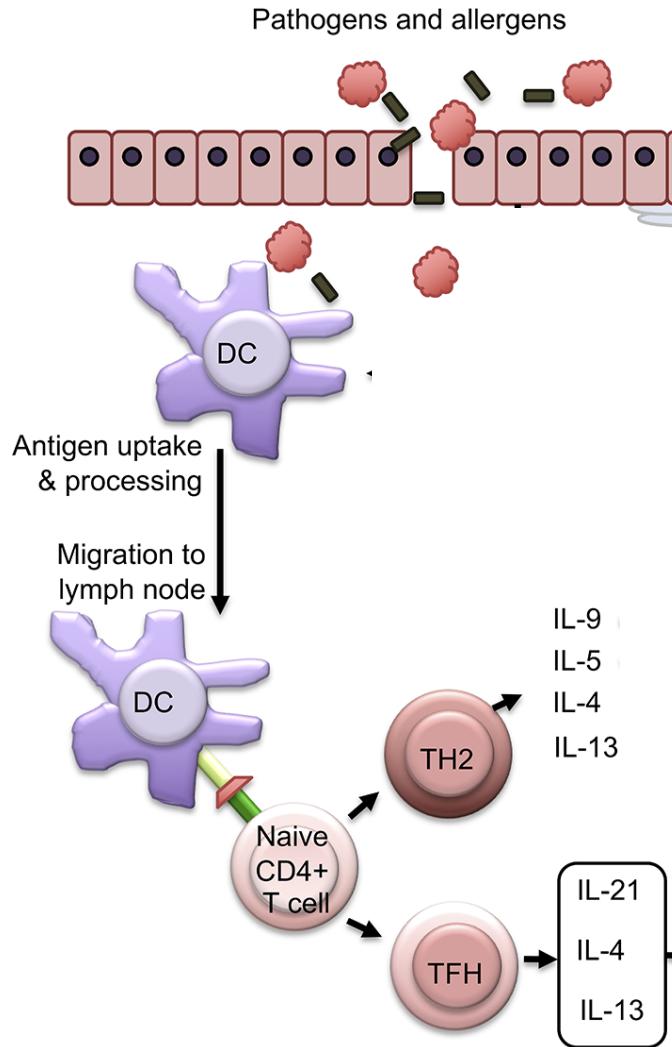
# Generazione dei linfociti Th2 e Tfh

(A)

CD4+ T cell priming & differentiation into Th2 and Tfh

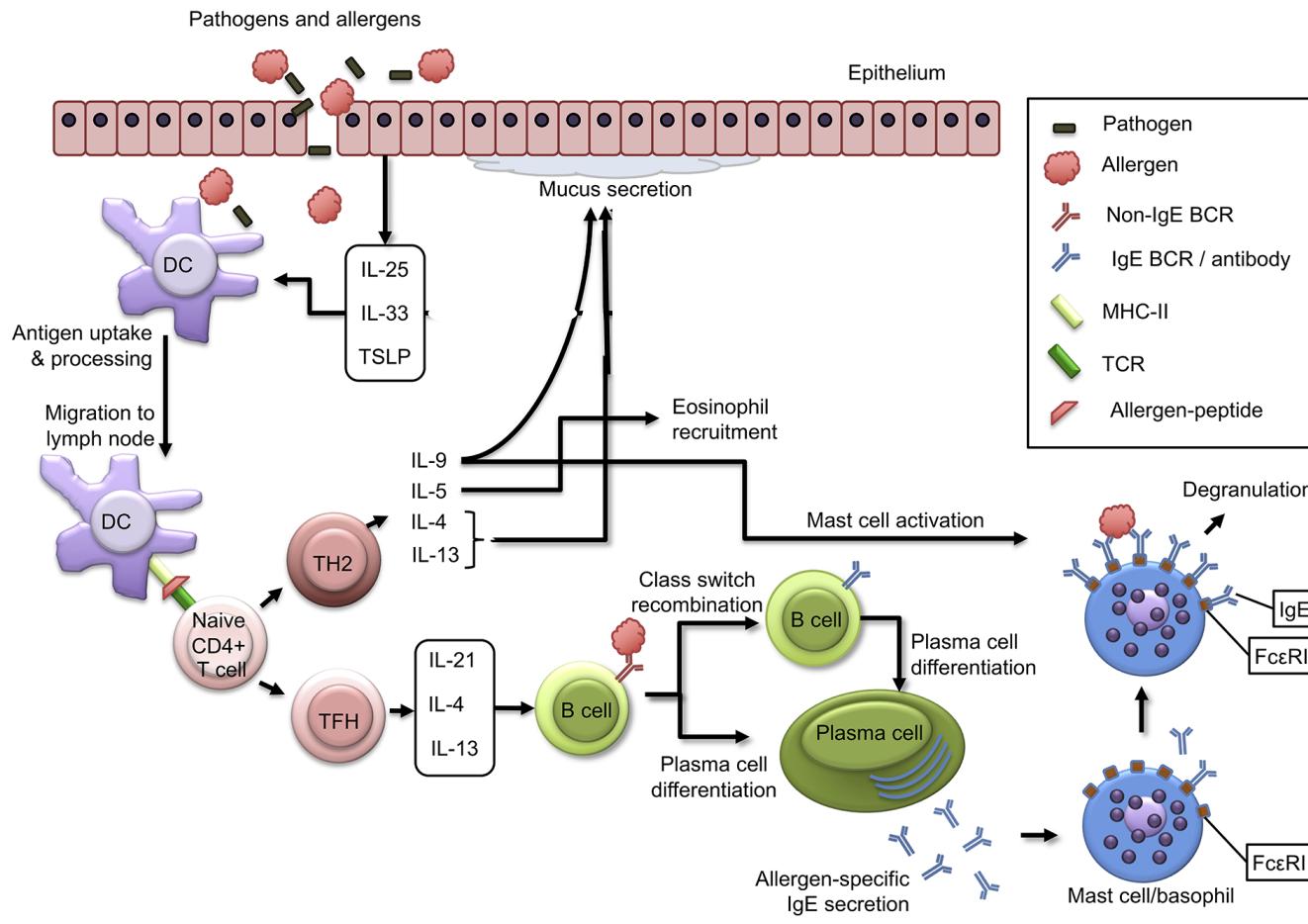


# Fase di sensibilizzazione all'allergene



Nella fase di sensibilizzazione sono indotti linfociti T helper 2 (Th2) e T helper follicolari. Questi ultimi sono necessari per la produzione di IgE allergene specifiche. L'attivazione dei linfociti T naive è mediata esclusivamente dalle cellule dendritiche al livello dei linfonodi.

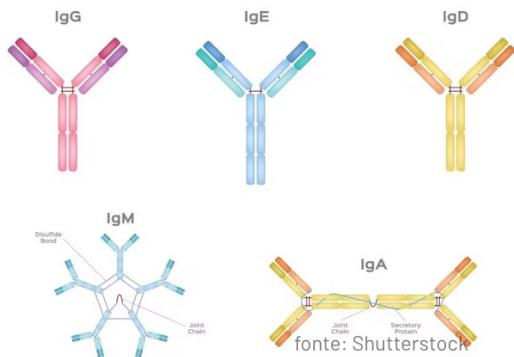
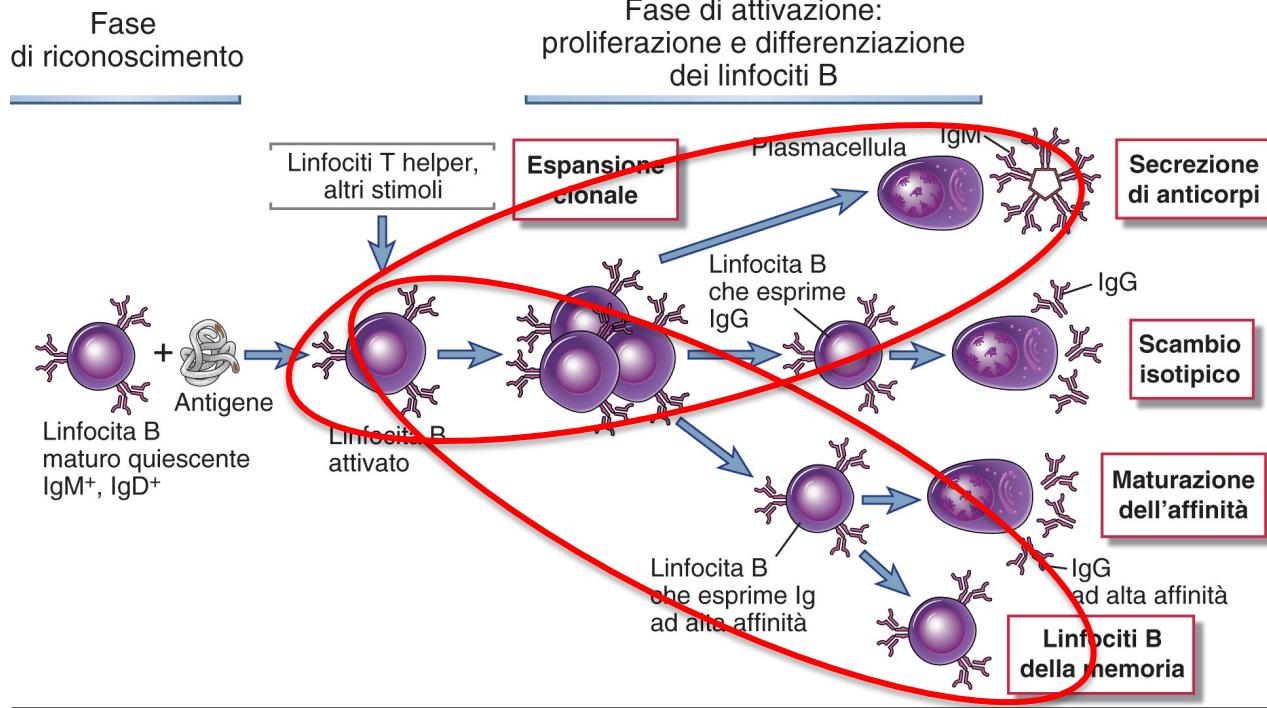
# Fase di sensibilizzazione all'allergene



Gli allergeni che attraversano la barriera epiteliale sono captati, processati e presentati dalle cellule dendritiche che a loro volta migrano nei linfonodi drenanti dove presentano l'antigene ai linfociti T naive. Il differenziamento dei linfociti T in Th2 e Tfh dipende dalla costimolazione e dalla presenza di particolari citochine.

I linfociti Th2 producono IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 mentre i linfociti T follicolari helper (Tfh) producono IL-4, IL-21 e IL-13.

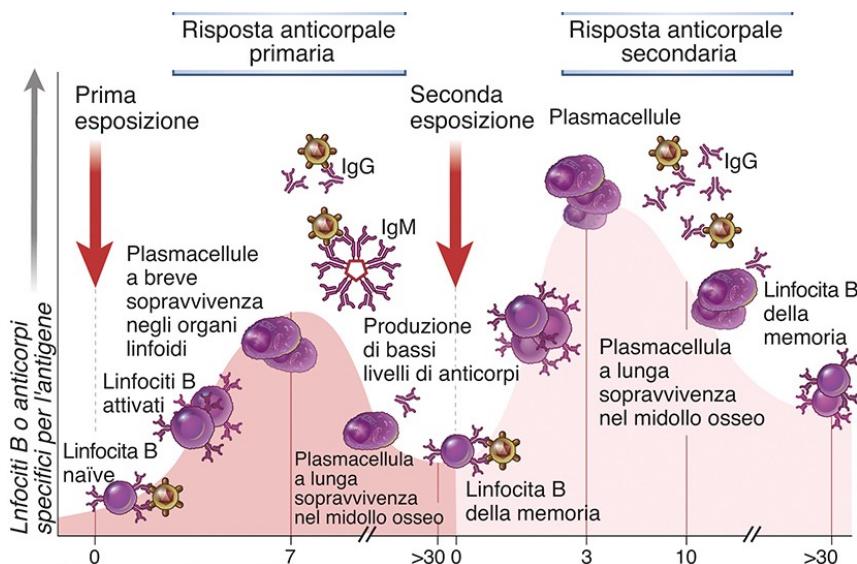
# Caratteristiche della risposta anticorpale



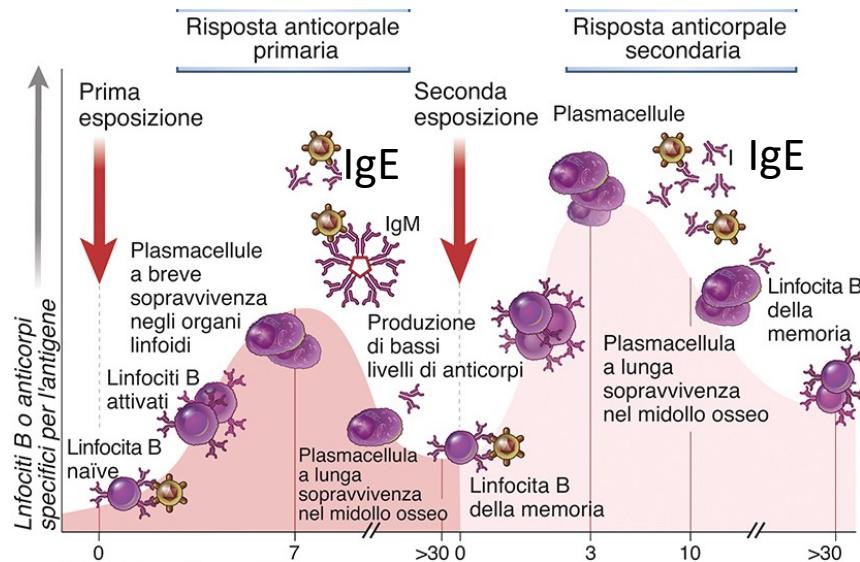
Le risposte anticorpali hanno inizio con il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfoctiti B naive. La risposta anticorpale genera cellule secerenti anticorpi (plasmacellule) e cellule della memoria che esprimono anticorpi con diverso isotipo (commutazione di classe) e con diversa affinità per l'antigene (ipermutazione somatica). Nelle risposte anticorpali verso antigeni T dipendenti come quelle indotte dagli allergeni, la progressione della risposta anticorpale ha bisogno dell'aiuto da parte dei linfoctiti T helper follicolari (Tfh).

# Risposta anticorpale

## Risposta anticorpale ad un antigene proteico



## Risposta anticorpale ad un allergene

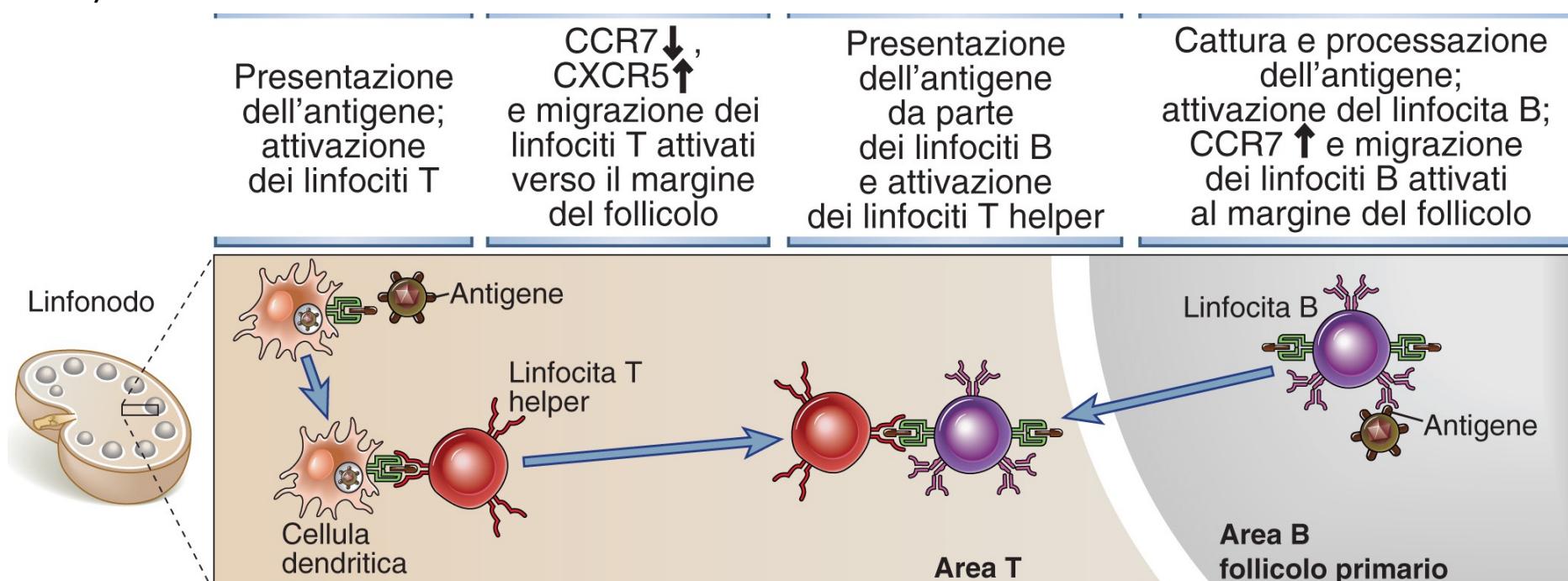


La risposta anticorpale nel corso delle reazioni allergiche è caratterizzata dalla produzione di IgE ad alta affinità per gli allergeni.

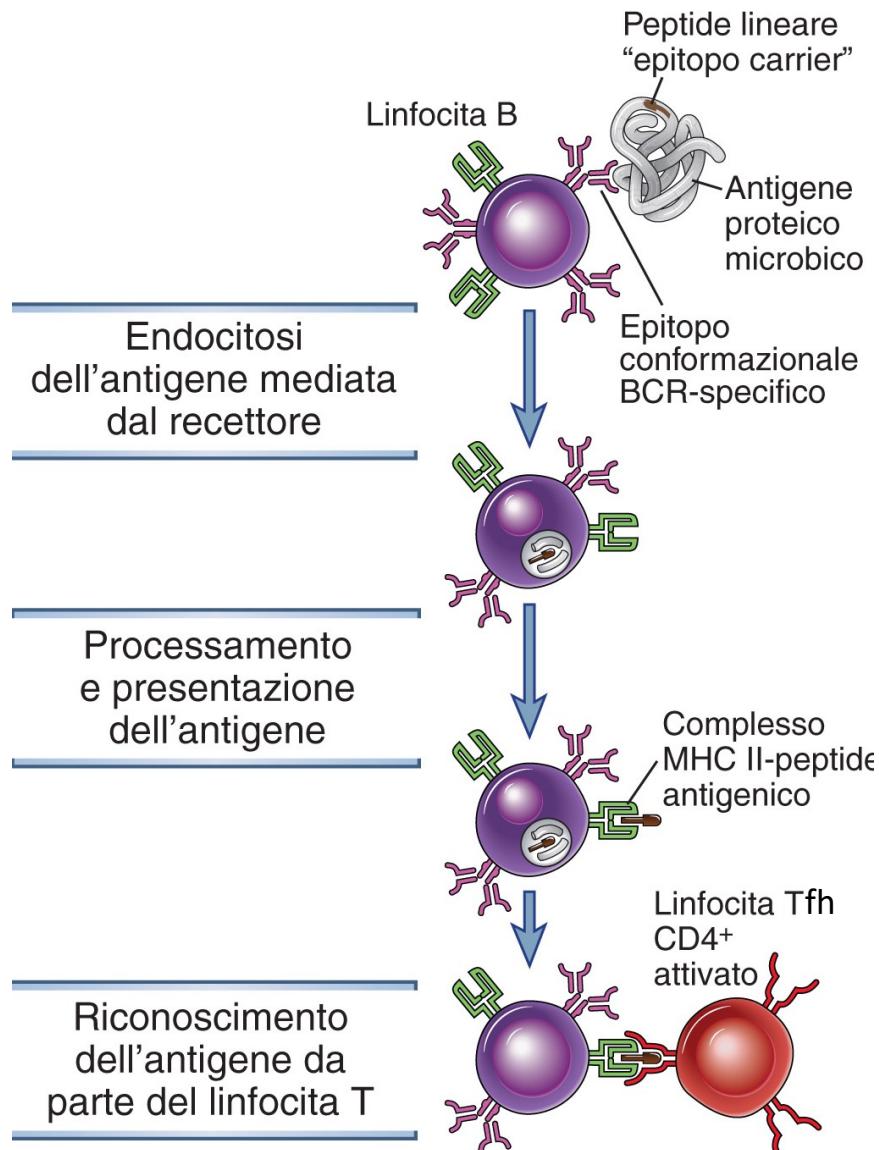
# Fasi della risposta antincorpale agli antigeni proteici

I linfociti B che esprimono un BCR specifico per un determinato antigene proteico devono interagire con i linfociti T specifici per lo stesso antigene per poter generare una risposta antincorpale.

- 1) Il linfocita B processa e presenta l'antigene in associazione con le molecole MHC di classe II
- 2) Il linfocita T deve essere attivato dalle cellule dendritiche che presentano e processano lo stesso antigene
- 3) I linfociti T e B attivati devono venire in contatto fra di loro

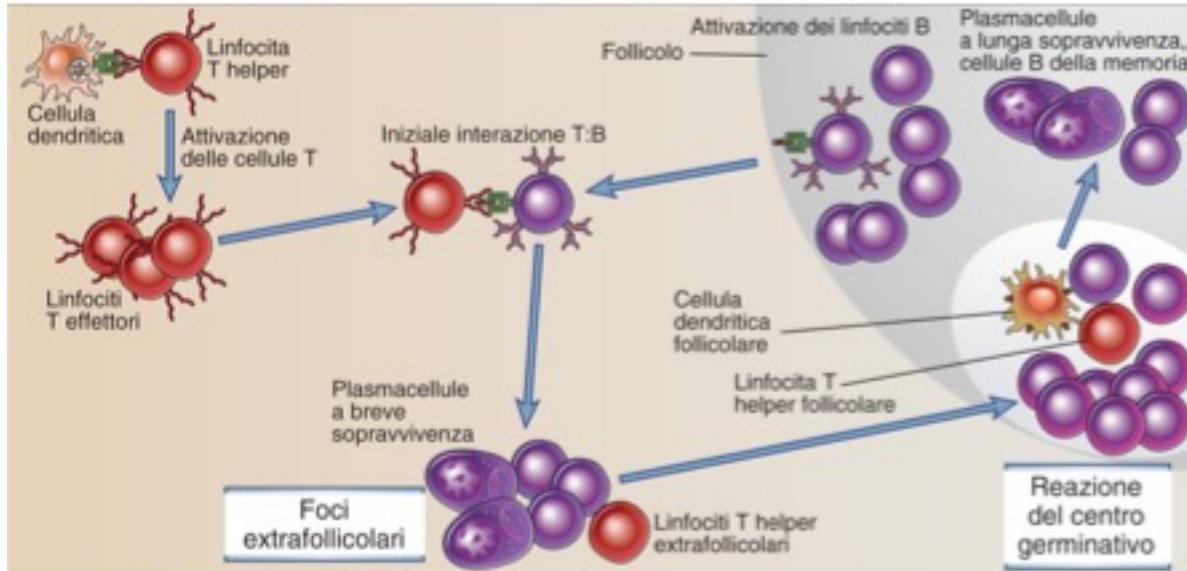


# 1) Il linfocita B processa e presenta l'antigene in associazione con le molecole MHC di classe II



Le risposte anticorpali agli antigeni proteici richiedono la captazione, il processamento e la presentazione dell'antigene da parte del linfocita B. Gli antigeni proteici vengono indirizzati a un compartimento vescicolare dove sono degradati in peptidi lineari che saranno associati alle molecole MHC di classe II.

# Reazione del centro germinativo

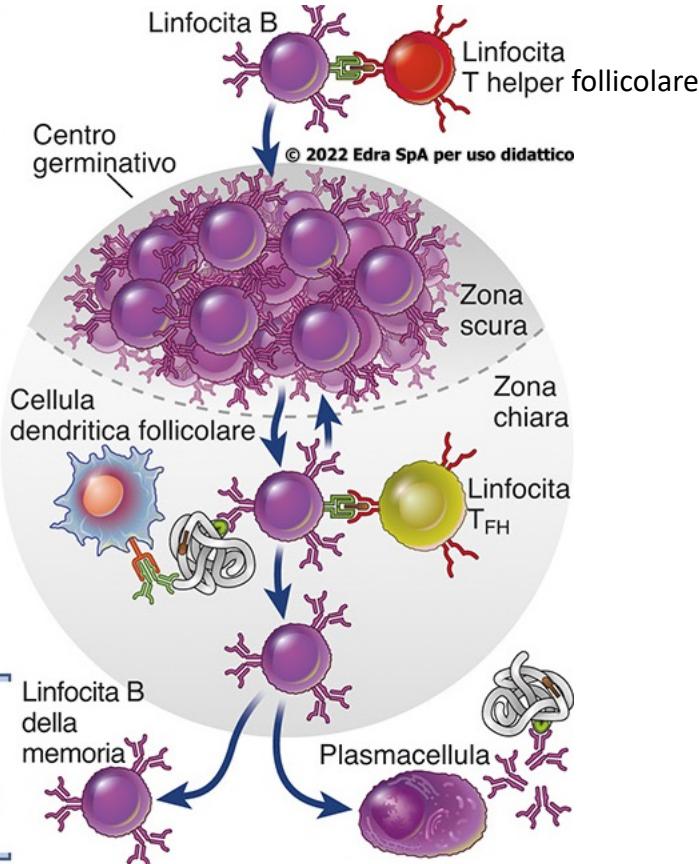
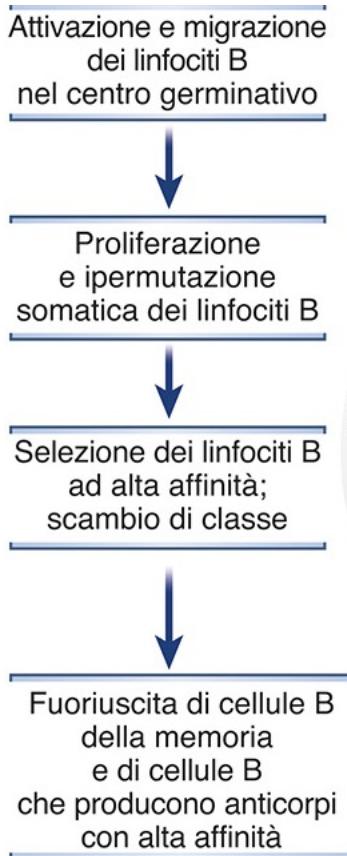


Nella zona di confine fra area T e B, i linfociti B che interagiscono con il Tfh possono generare plasmacellule secernenti anticorpi e effettuare commutazione di classe.

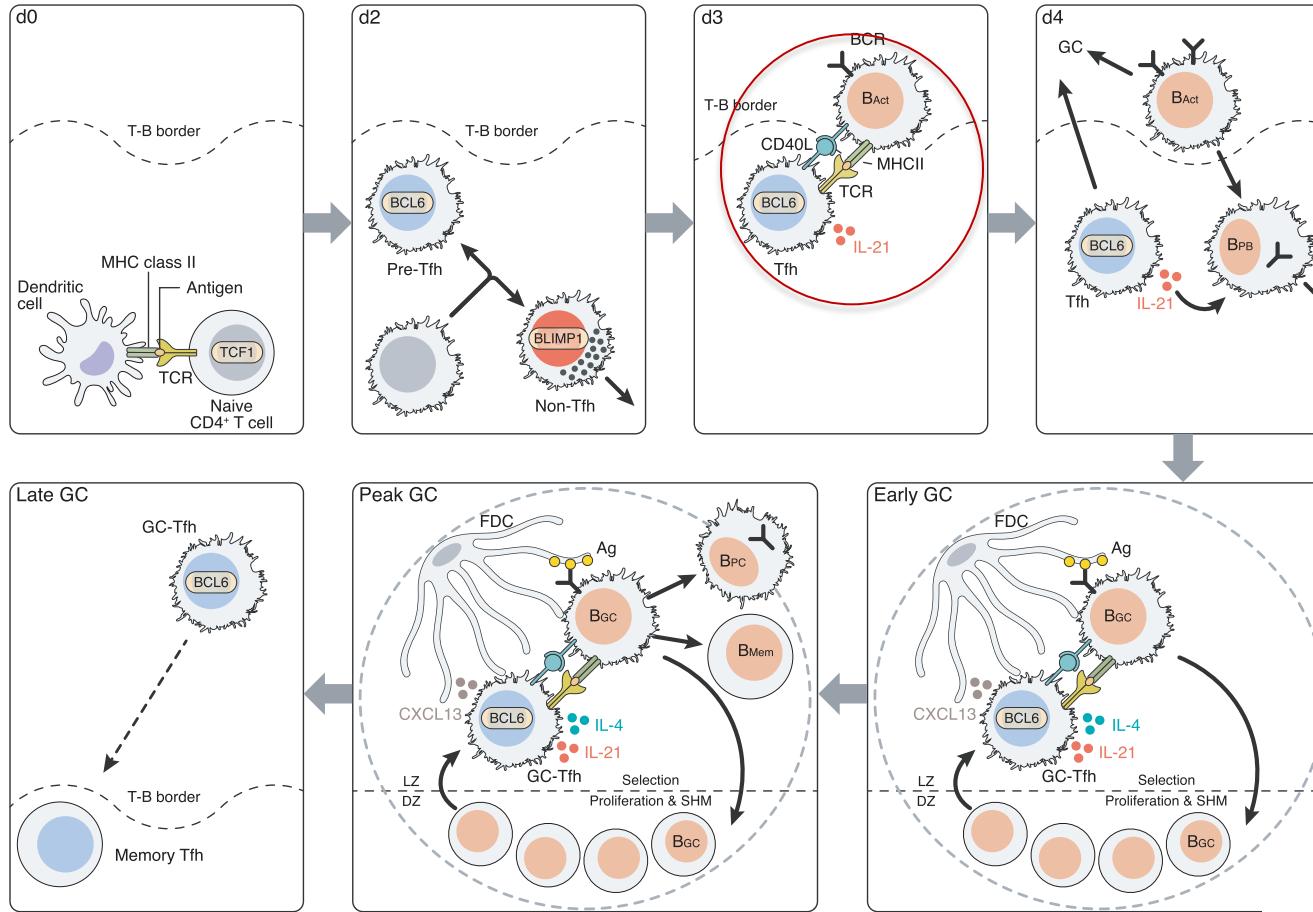
I linfociti T in seguito all'interazione con le cellule B nella zona di confine fra area T e follicolo entrano nel follicolo. Contemporaneamente un numero limitato di linfociti B ritorna nel follicolo e inizia a proliferare formando una regione più chiara denominata centro germinativo.

All'interno del centro germinativo è presente una zona più scura costituita dai linfociti B proliferanti. Nel centro germinativo hanno luogo: i) generazione di plasmacellule a lunga vita; ii) generazione delle cellule della memoria iii) ipermutazione somatica iv) commutazione di classe.

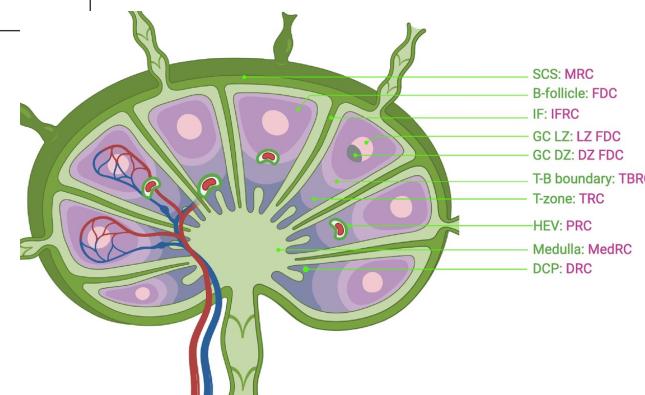
# Il centro germinativo



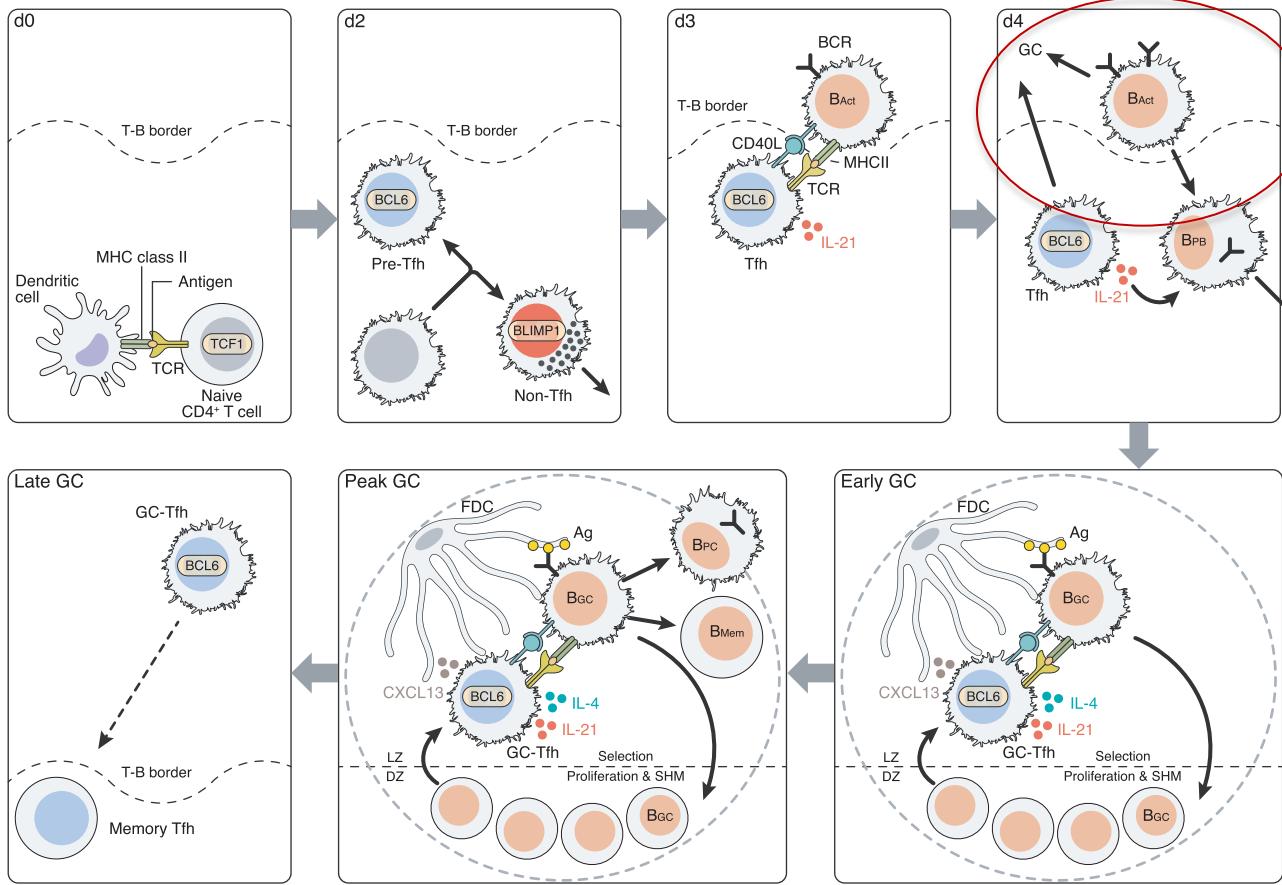
# La risposta anticorpale ad antigeni proteici necessita dell'aiuto dei linfociti T



In seguito alla attivazione dei linfociti B dopo il riconoscimento dell'antigene da parte dell'IgM espressa sulla membrana, la risposta anticorpale per poter procedere ha bisogno dell'aiuto e cioè della interazione con i linfociti T.

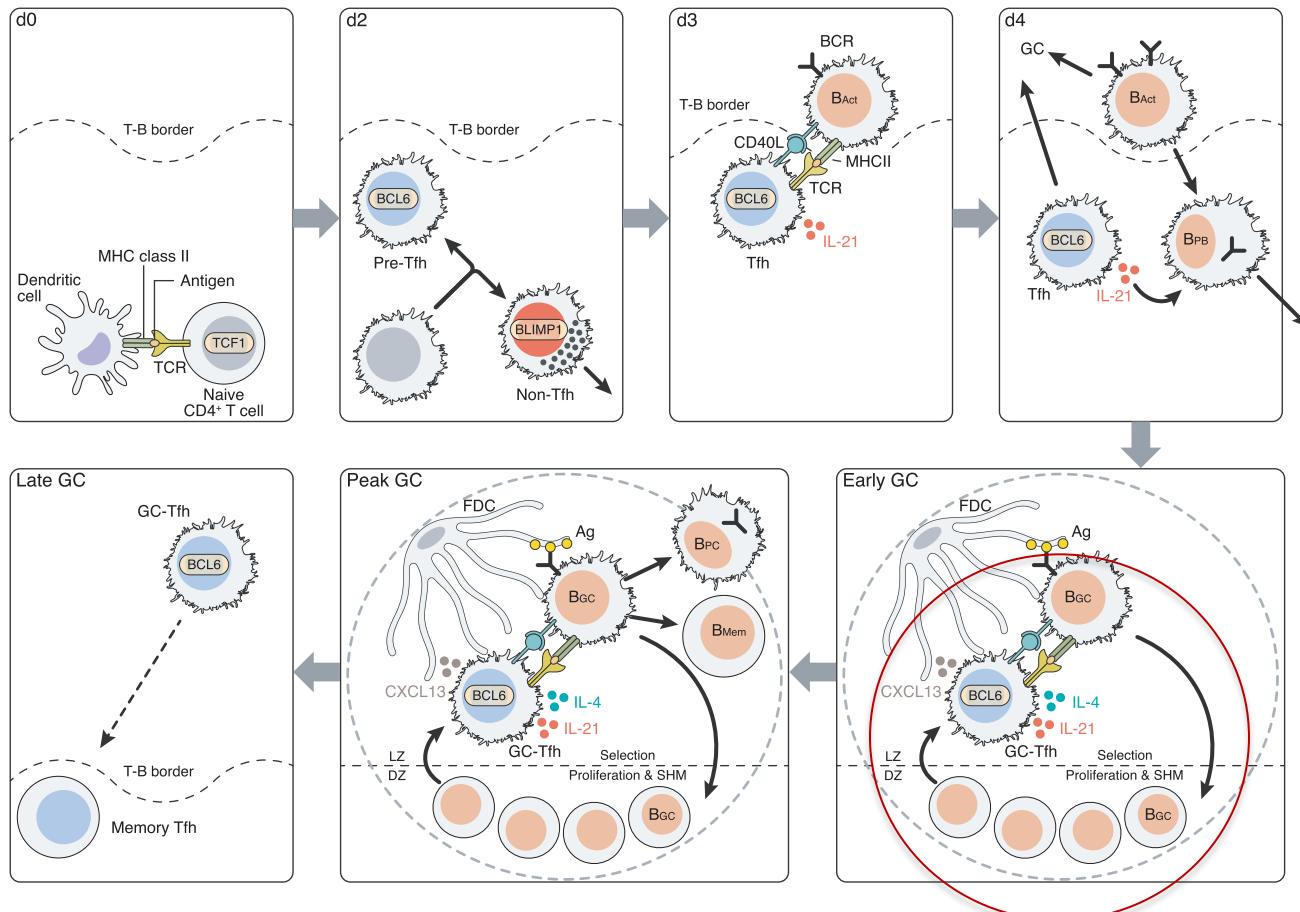


# Cinetica e interazioni nella risposta dei linfociti Tfh e B



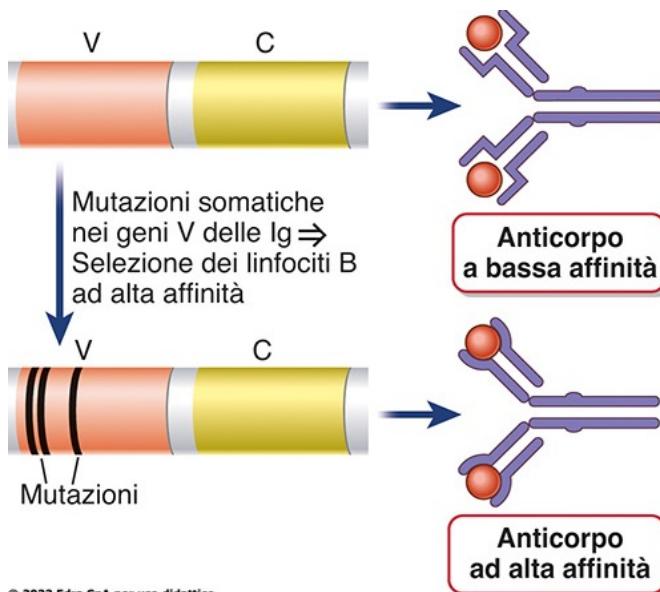
Nella zona di confine fra area T e B del linfonodo i linfociti interagiscono fra di loro. I linfociti B specifici per l'antigene lo captano e lo presentano ai linfociti Tfh. Questi ultimi attraverso l'interazione CD40L-CD40 e la produzione di citochine inviano al linfocita B i segnali necessari per la proliferazione e il differenziamento in plasmacellule e in cellule B del centro germinativo (B<sub>GC</sub>).

Inoltre la segnalazione CD40-CD40L è necessaria affinchè i linfociti B effettuino la commutazione di classe della catena pesante.

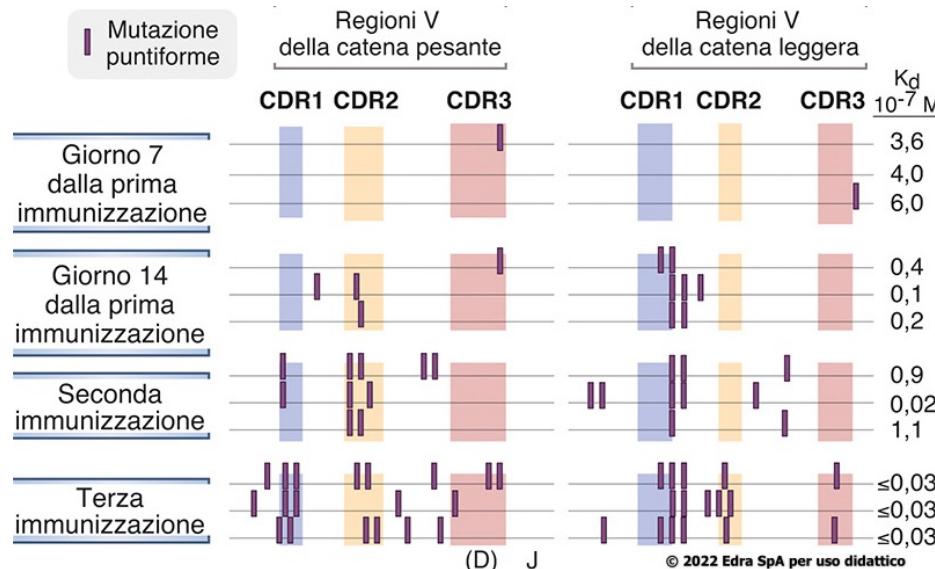


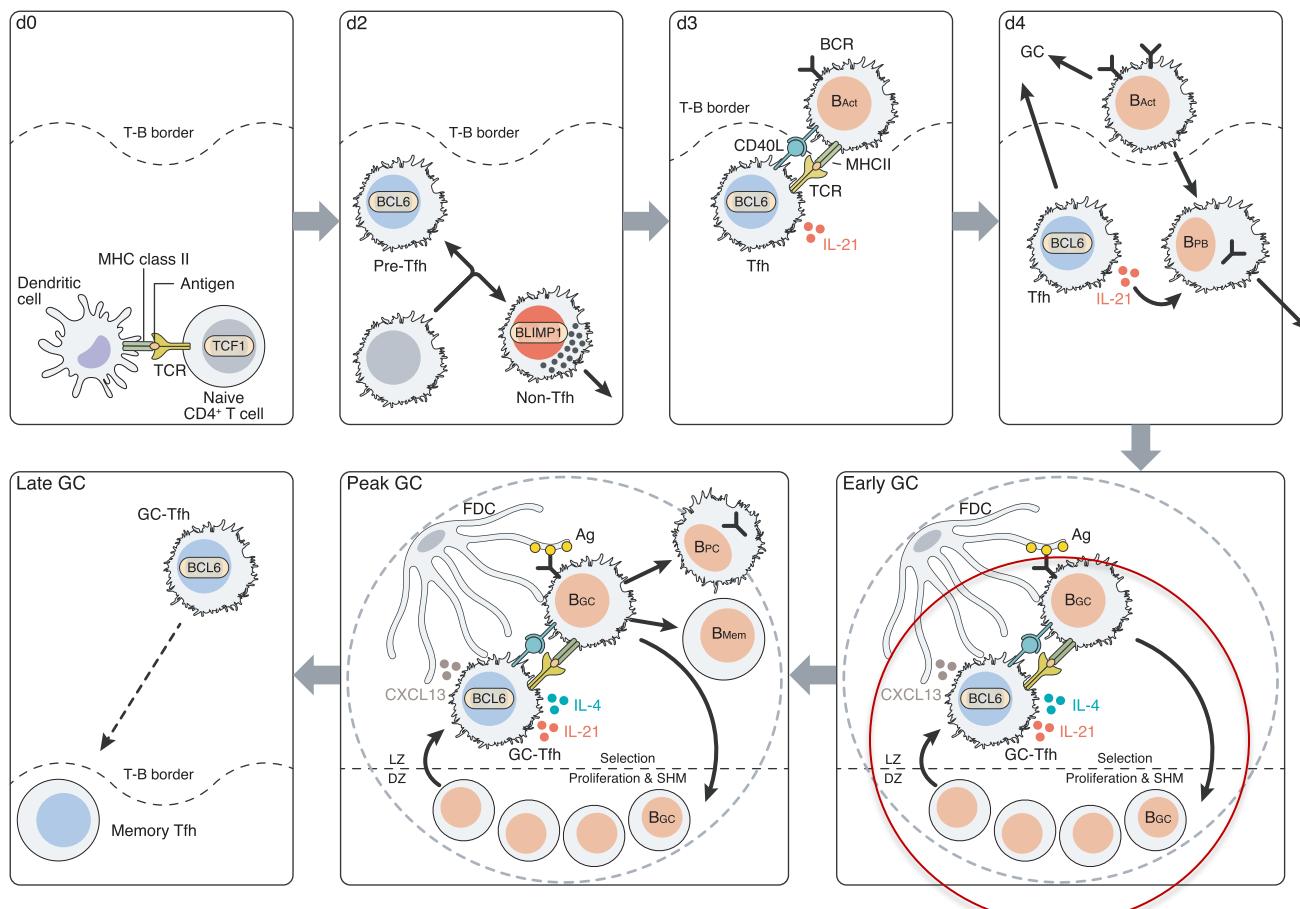
I B<sub>GC</sub> entrano nel follicolo e iniziano a proliferare generando il centro germinativo che è costituito da una zona scura dove le cellule B sono attivamente proliferanti e dove avviene l'ipermutazione somatica e una zona chiara dove sono selezionati i linfociti che esprimono un recettore con elevata affinità per l'antigene (Early GC).

# Ipermutazione somatica



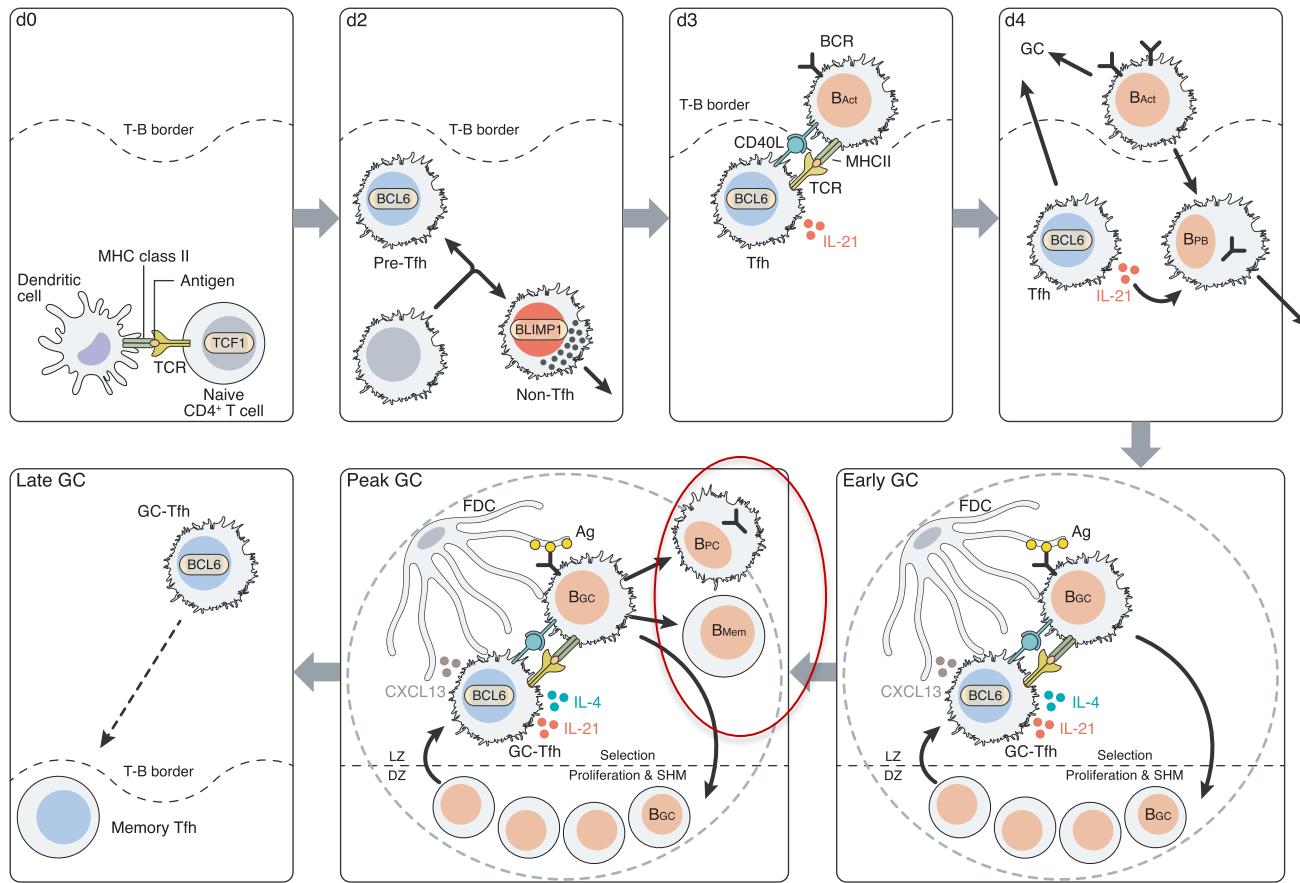
Nei linfociti B della zona scura che stanno proliferando i geni V che codificano per la regione variabile dell'immunoglobulina vanno incontro a mutazioni puntiformi con elevata frequenza.





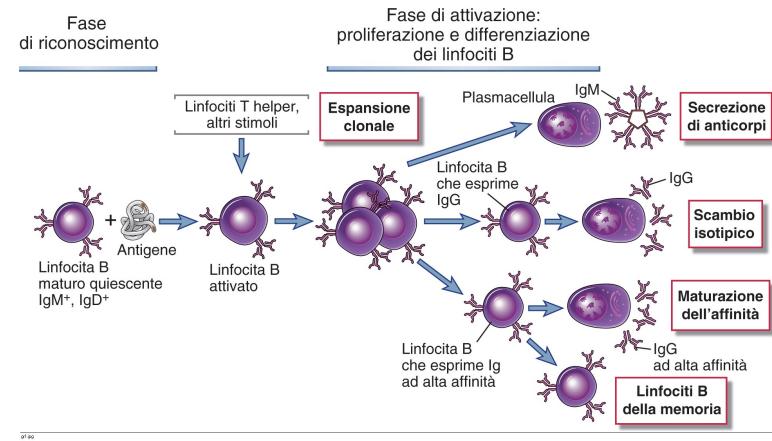
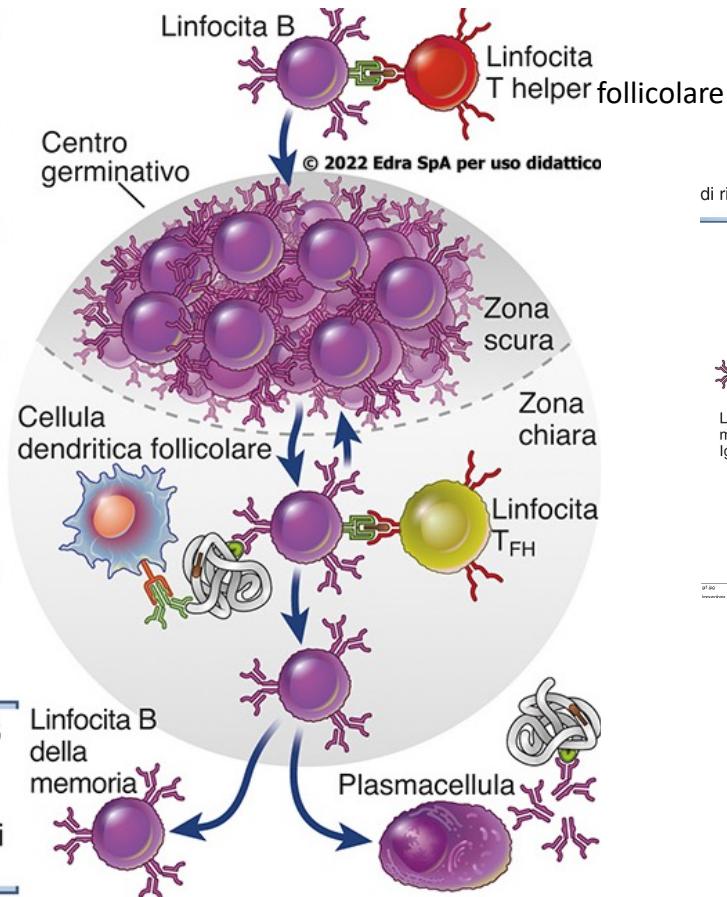
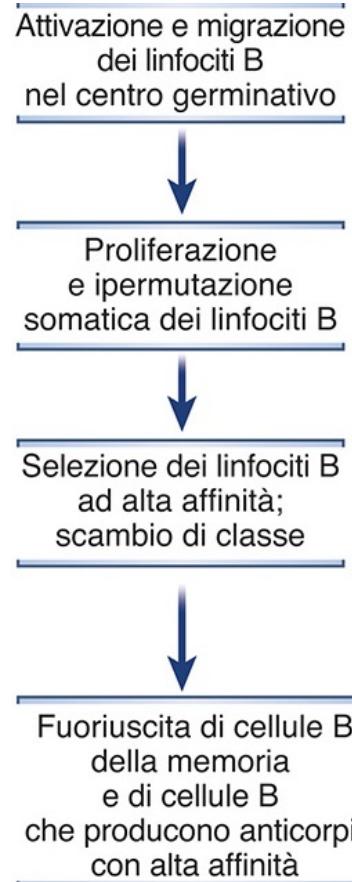
Nella zona chiara saranno selezionati i linfociti B che sono in grado di presentare l'antigene a Tfh. Per questo saranno avvantaggiati i linfociti B che presentano un BCR con elevata affinità per l'antigene. I linfociti B che non ricevono segnali dai linfociti Tfh andranno incontro a morte.

Nella zona chiara i linfociti B possono anche effettuare lo scambio di classe o commutazione di classe anticorpale.

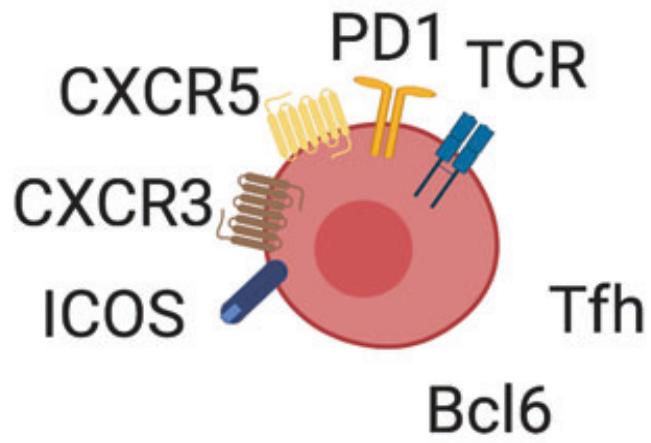


Nel centro germinativo  
I linfociti Tfh oltre a controllare la selezione dei linfociti B con alta affinità per l'antigene regolano anche lo sviluppo dell'immunità umorale a lungo termine attraverso il differenziamento delle cellule B<sub>CG</sub> in plasmacellule a lunga vita e cellule B della memoria.

# Il centro germinativo



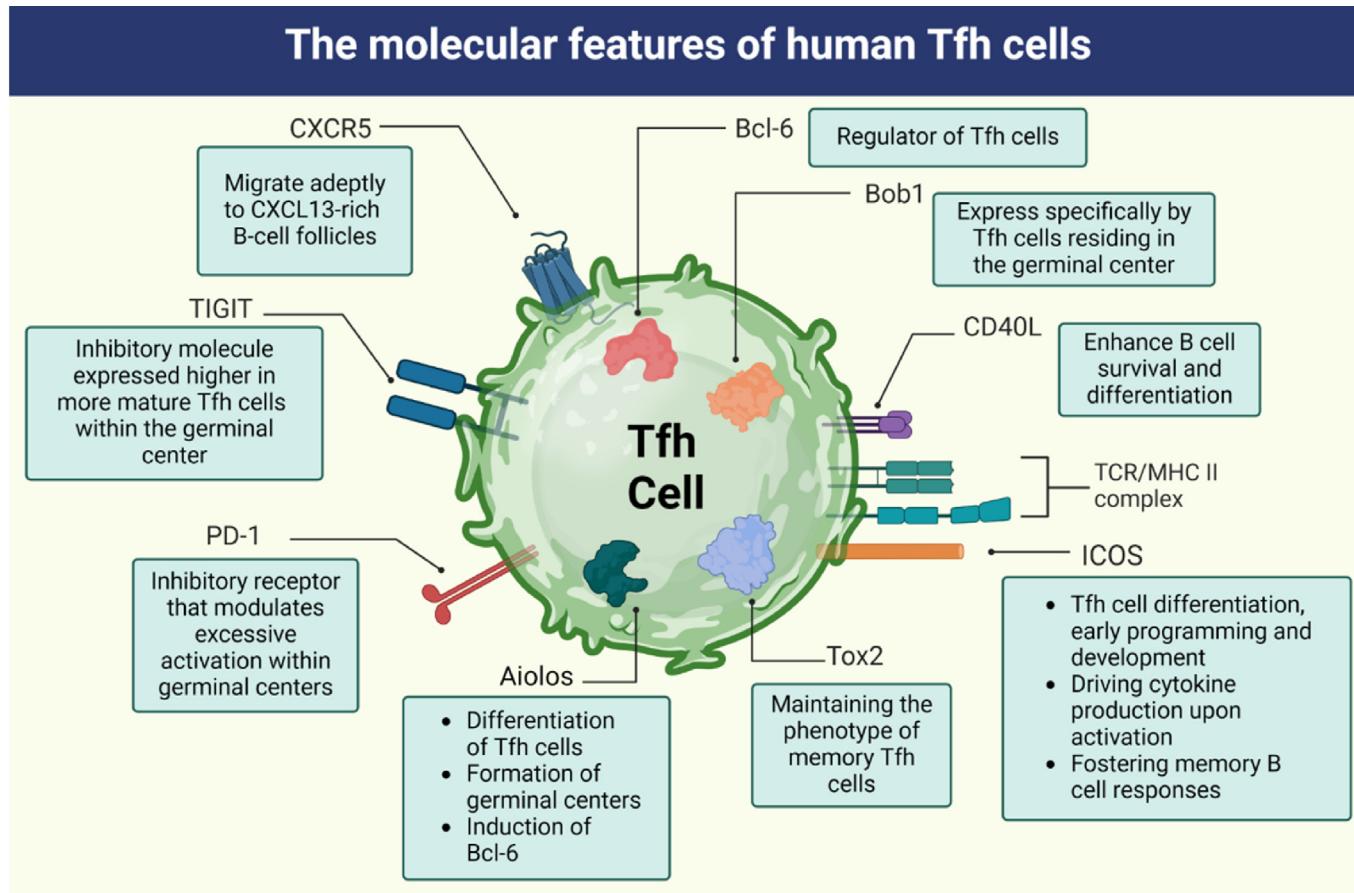
## Caratteristiche dei linfociti T follicolari (Tfh)



A partire dal 2000 è stata descritta una sottopopolazione di linfociti T helper specializzata nel cooperare con le cellule B nella produzione di anticorpi. Queste cellule definite linfociti T helper follicolari (Tfh) sono caratterizzate dall'espressione di CXCR5 (ligando CXCL13), PD-1, ICOS e il repressore trascrizionale BCL6 e dalla produzione di IL-21.

Le Tfh possono produrre anche IFN- $\gamma$  o IL-4.

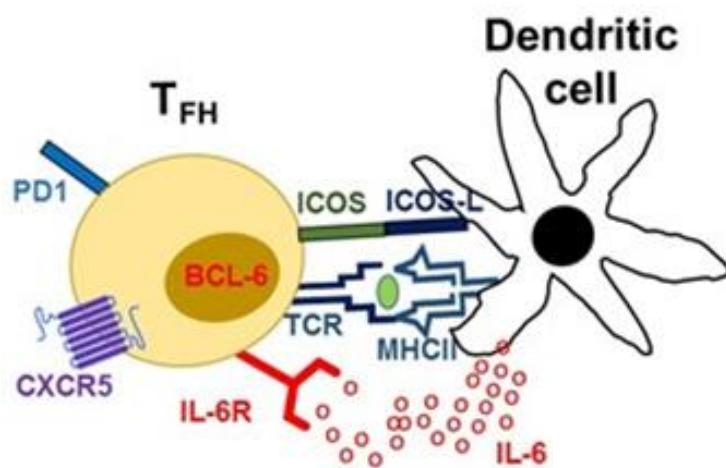
# Caratteristiche molecolari dei Tfh nell'uomo



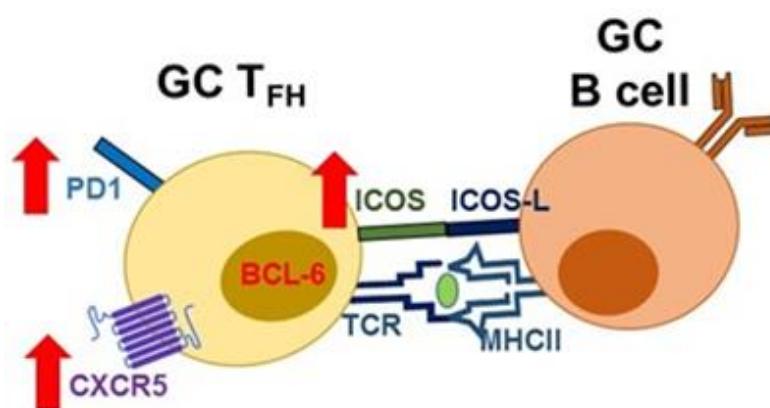
**Fig. 1.** Molecular characteristics of human Tfh cells. Representative molecules including surface receptor, stimulatory molecules, inhibitory molecules, and transcription factors associated with human Tfh cells are illustrated and described.

# Differenziamento dei Tfh

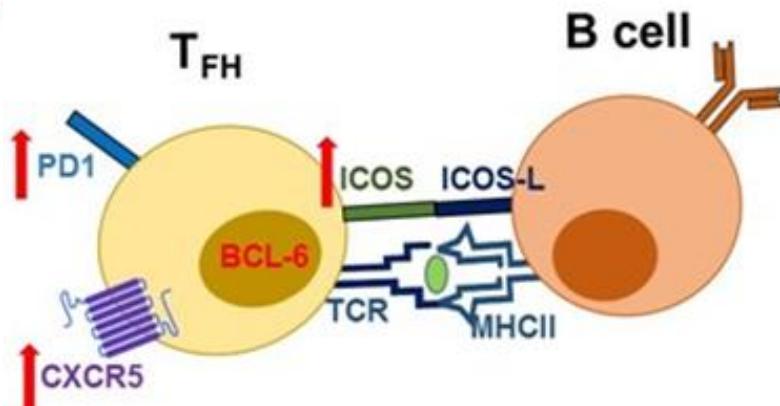
## Step 1: T cell zone



## Step 3: B cell zone



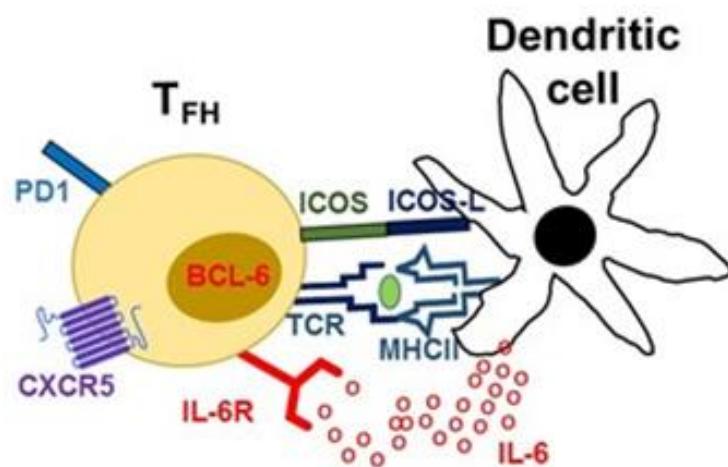
## Step 2: T:B cell border



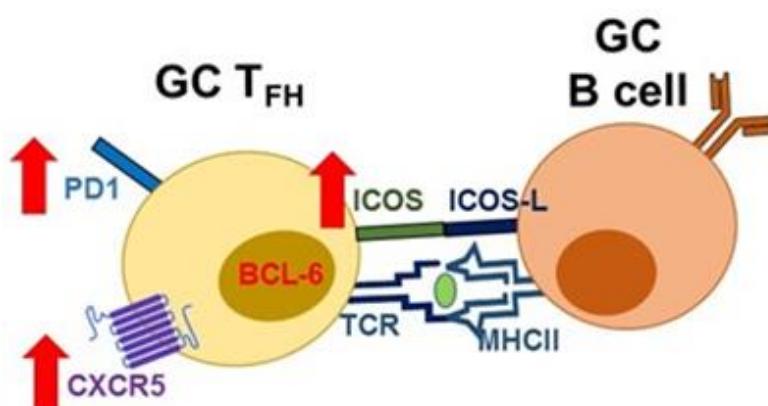
Il differenziamento dei Tfh è un processo multi-fasico che ha inizio nella zona T degli organi linfoidi secondari. Inizialmente i TCD4+ naive riconoscono l'antigene presentato in associazione alle molecole MHC di classe II da parte delle cellule dendritiche. Questo in associazione alle citochine prodotte dalle DC e alla segnalazione inviata attraverso ICOS induce l'espressione di BCL-6 e indirizza il differenziamento delle cellule verso i Tfh.

# Differenziamento dei Tfh

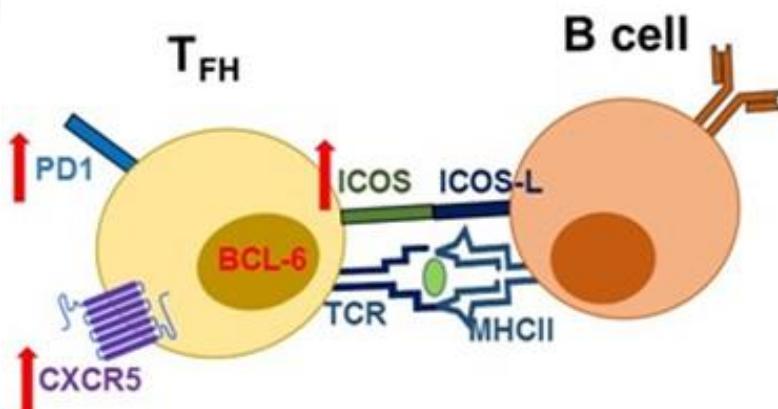
## Step 1: T cell zone



## Step 3: B cell zone

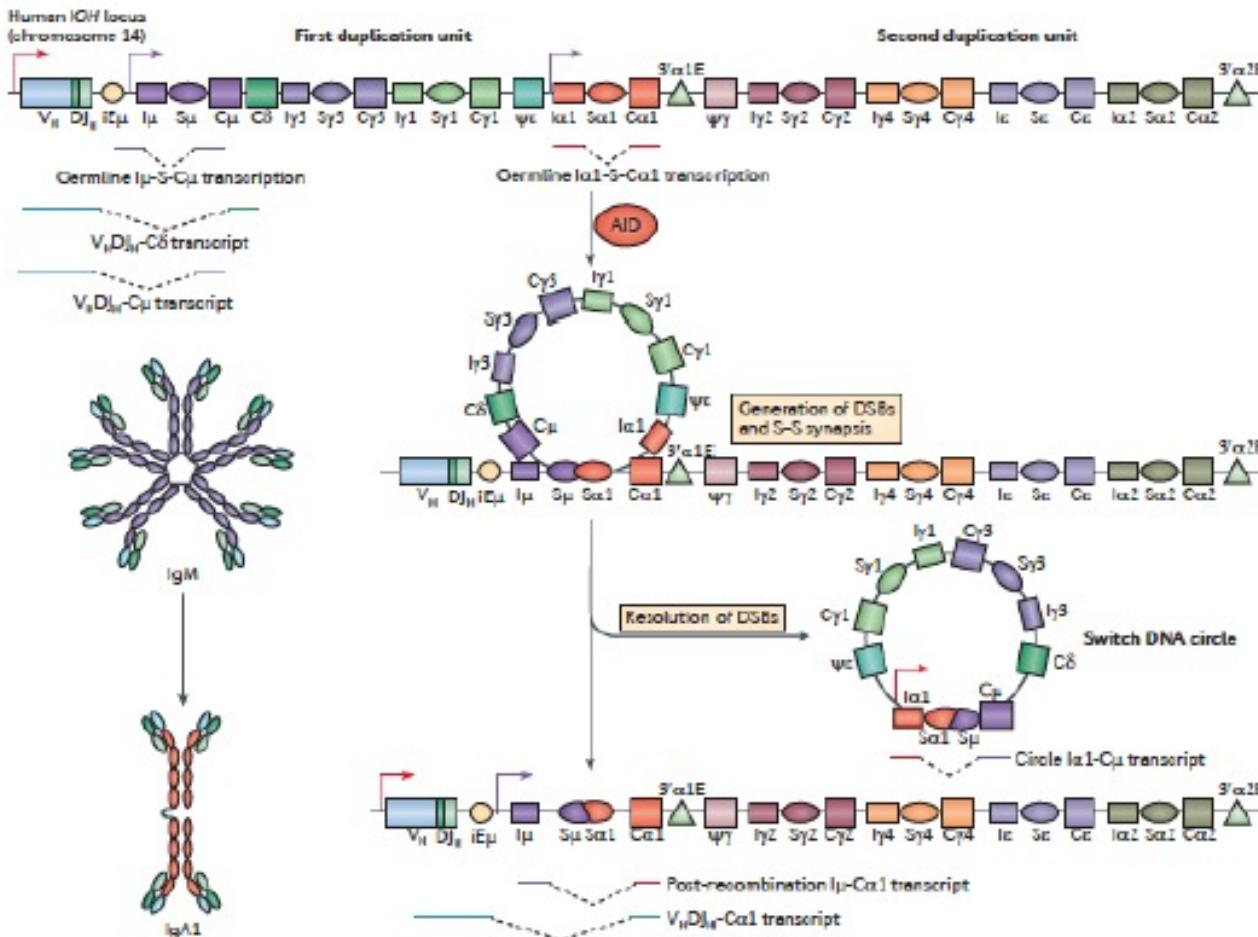


## Step 2: T:B cell border



I linfociti T che differenziano in Tfh up-regolano il CXCR5 e down-regolano il CCR7 permettendo alle cellule di muoversi nella zona di confine T-B. Il riconoscimento dell'antigene presentato in associazione alle molecole MHC di classe II da parte dei B promuove ulteriormente il differenziamento dei Tfh che up-regolano CXCR5, PD1 e ICOS e raggiungono la maturazione nel centro germinativo. La segnalazione da parte di ICOS ha un ruolo importante nel differenziamento dei Tfh.

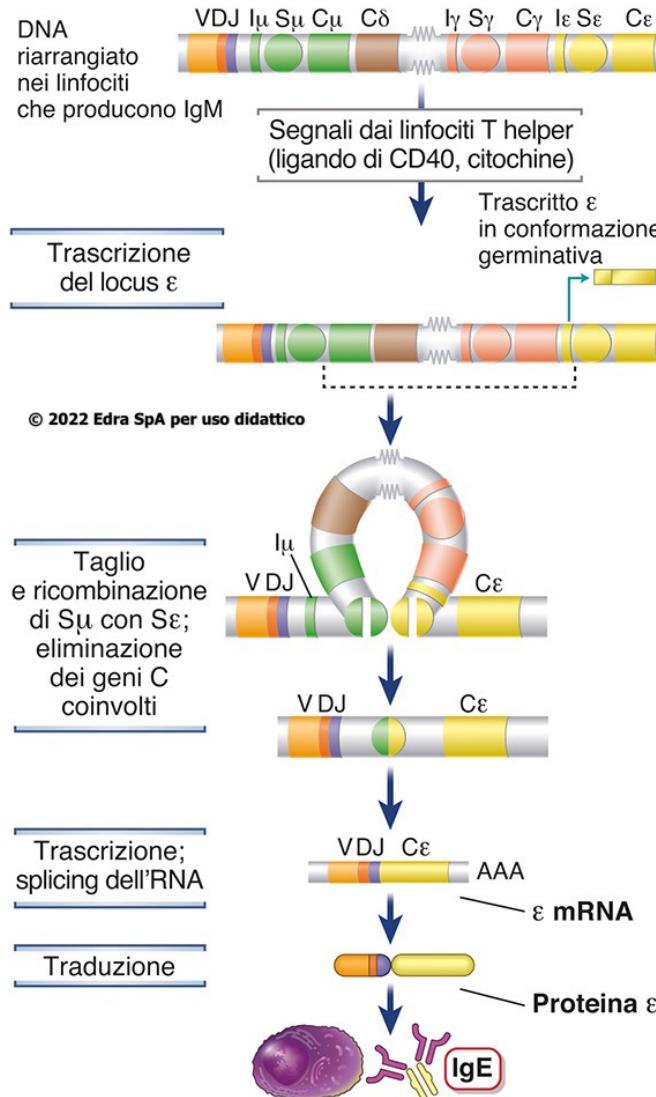
# Commutazione di classe delle Immunoglobuline



**Figure 1 | CSR entails DNA deletion.** Class-switch DNA recombination (CSR) exchanges the gene encoding the immunoglobulin heavy chain constant region ( $C_{\mu}$ ) with one of a set of downstream  $C_{\mu}$  genes (the figure depicts CSR between  $S_{\mu}$  and  $S_{\alpha 1}$  in the human immunoglobulin heavy chain (IgH) locus). This deletion–recombination reaction requires activation-induced cytidine deaminase (AID) and involves the generation of DNA double-strand breaks (DSBs) in switch (S) regions (which lie upstream of the  $C_{\mu}$  gene) followed by DSB repair. This leads to the juxtaposition of rearranged  $V_{H}D_{JH}$  DNA (which encodes the heavy chain variable region) with a downstream  $C_{\mu}$  exon cluster and deletion of the intervening sequence between S regions as an extrachromosomal circle.  $\psi$ , pseudogene; 3'E, 3'α1E enhancer; I<sub>H</sub>, IgH intronic enhancer; I<sub>α</sub>, IgH intervening region.

La commutazione di classe è il processo che permette che una parte dei linfociti B attivati produca anticorpi con stessa specificità per l'antigene e diversa regione costante (isotipo). La commutazione di classe avviene attraverso la sostituzione di un cluster costante (es:  $C_{\mu}$ ) con un altro cluster (es:  $C_{\gamma}$ ). La commutazione di classe può avvenire nella zona di confine fra l'area T e l'area B o nel centro germinativo.

# Commutazione di classe/switch isotipico/della catena pesante

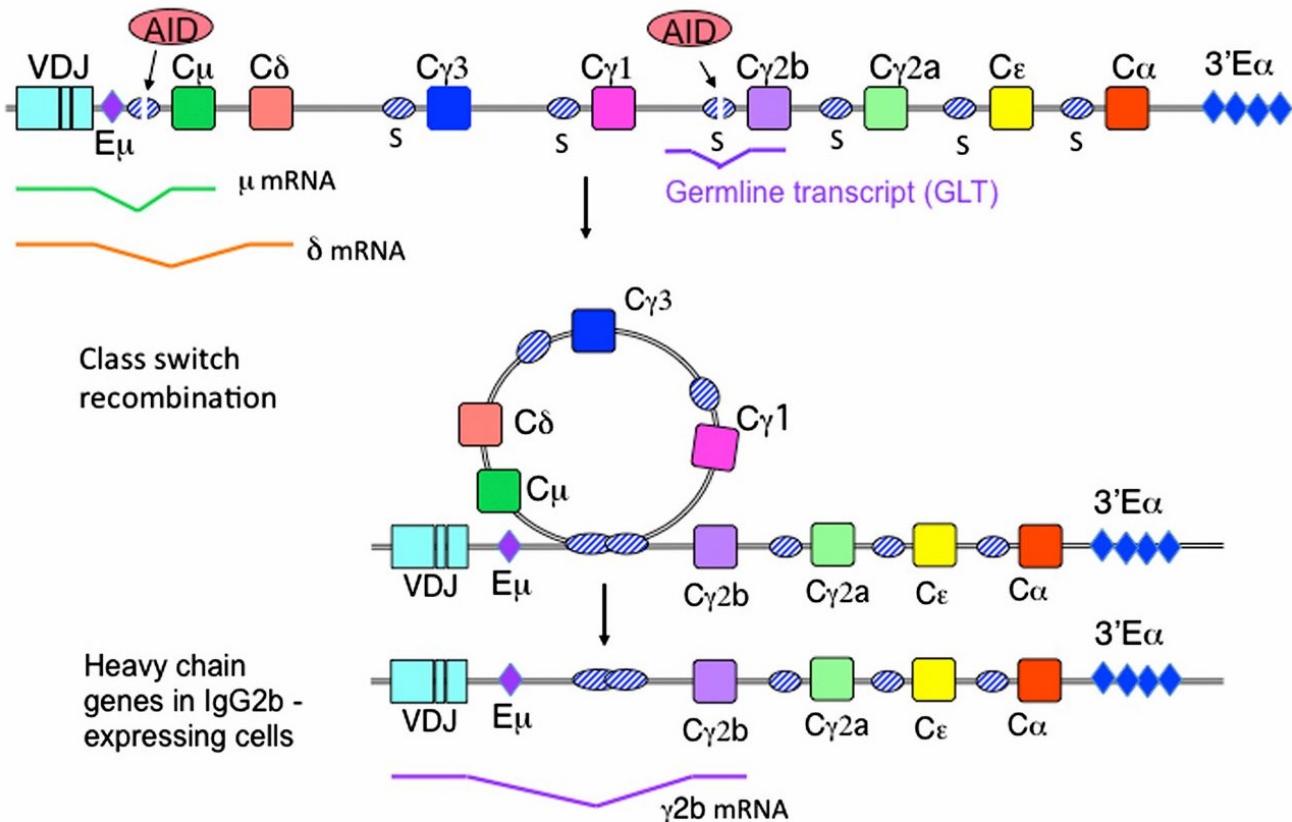


Lo scambio di classe è un processo di ricombinazione in cui la regione del DNA che codifica per la regione costante della catena pesante della immunoglobulina viene tagliata e ricombinata in modo tale per cui l'esone VDJ che codifica per la regione V viene posto accanto ad una regione costante più a valle ed il DNA interposto eliminato

Lo scambio isotipico è regolato dalle citochine prodotte dai linfociti T helper follicolari e dalla interazione CD40 (espresso sui linfociti B) con il CD40 ligando (CD40L) espresso dai linfociti Tfh attivati.

Lo scambio isotipico verso le IgE richiede la citochina IL-4.

### Heavy chain genes in IgM expressing cells

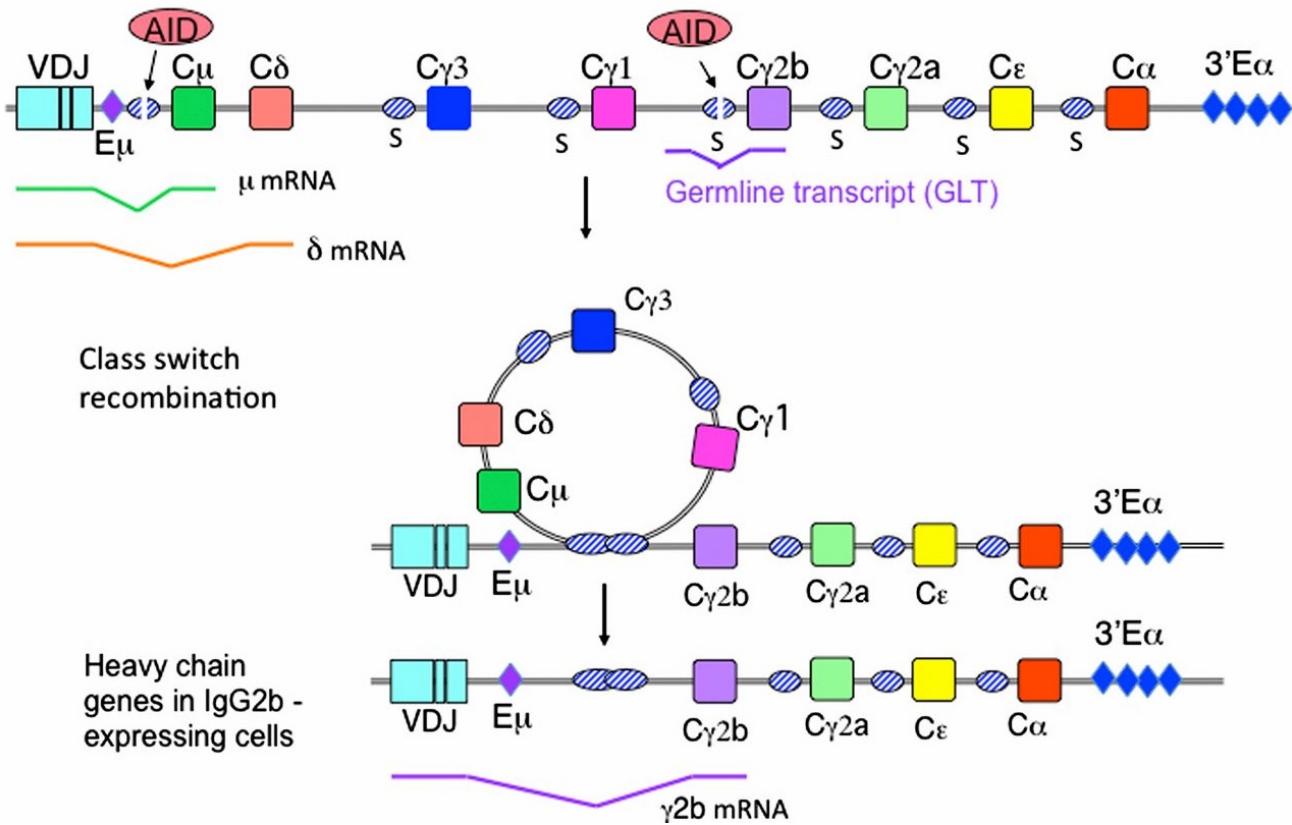


Nello scambio isotipico gli eventi di ricombinazione coinvolgono sequenze nucleotidiche che sono presenti al 5' di ogni locus  $C_H$  che sono definite switch regions.

Queste sequenze presentano un esone I (iniziatore della trascrizione) preceduto da una regione promatrice.

Affinchè possa avvenire la ricombinazione fra le sequenze di switch è necessario che avvenga la trascrizione delle sequenze I-S-C. Tali trascritti germinativi non sono tradotti in proteine.

### Heavy chain genes in IgM expressing cells



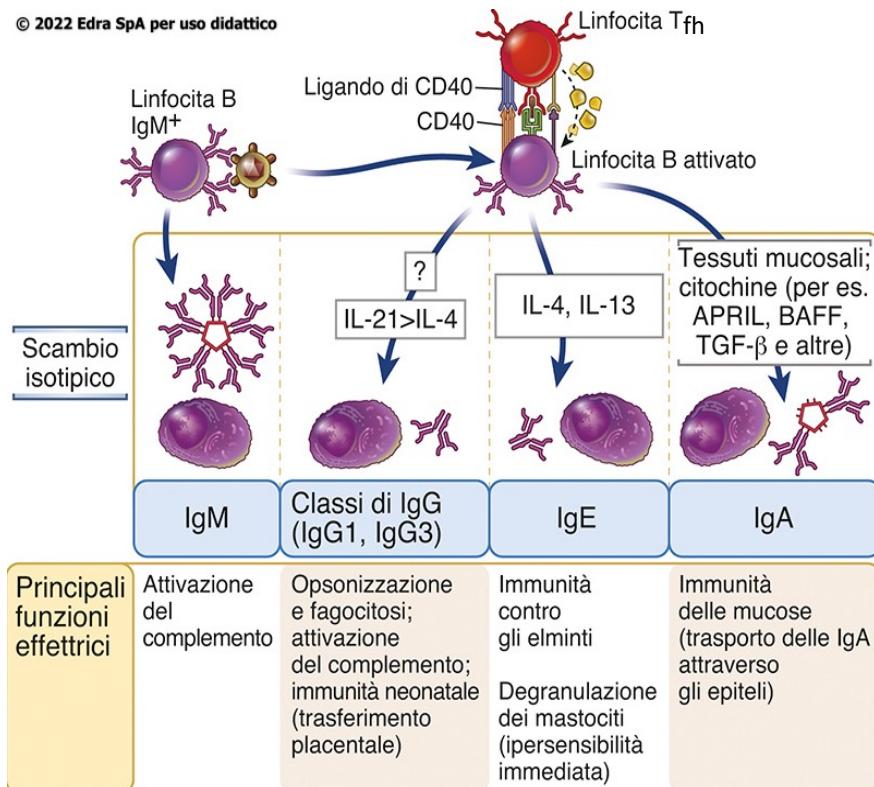
I trascritti germinativi sono presenti a livello del locus  $\mu$  che del locus della catena pesante coinvolta nello scambio isotipico.

I trascritti germinativi permettono la formazione di catene ibride DNA-RNA con un filamento di DNA lasciando libero l'altro filamento sul quale agirà l'enzima AID (activation induced deaminase) responsabile dello scambio isotipico.

L'interazione fra CD40 e CD40L induce l'espressione di AID.

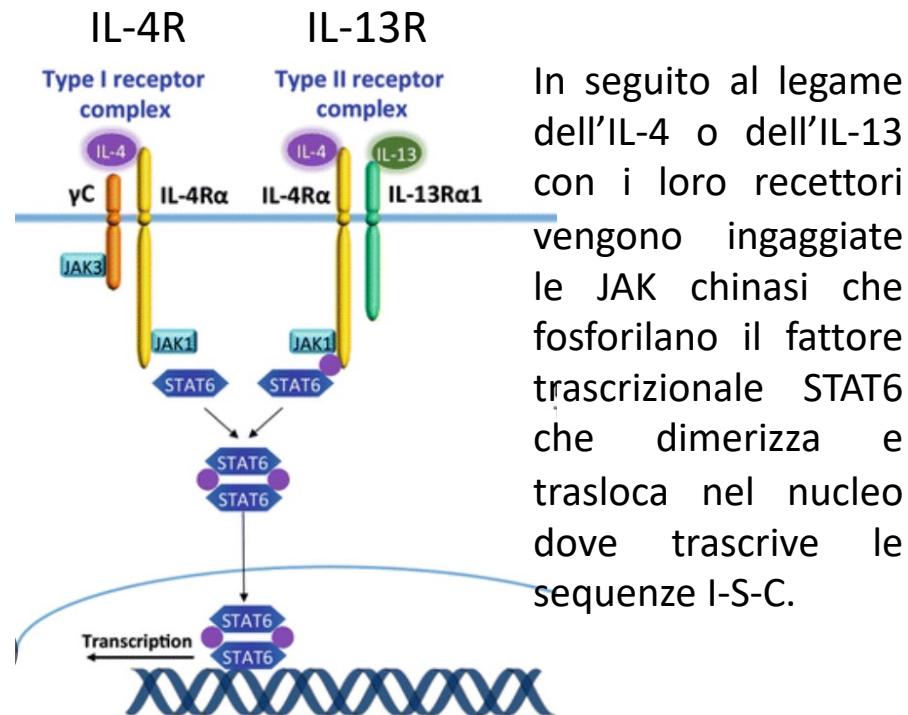
# Ruolo delle citochine nello switch isotipico

© 2022 Edra SpA per uso didattico



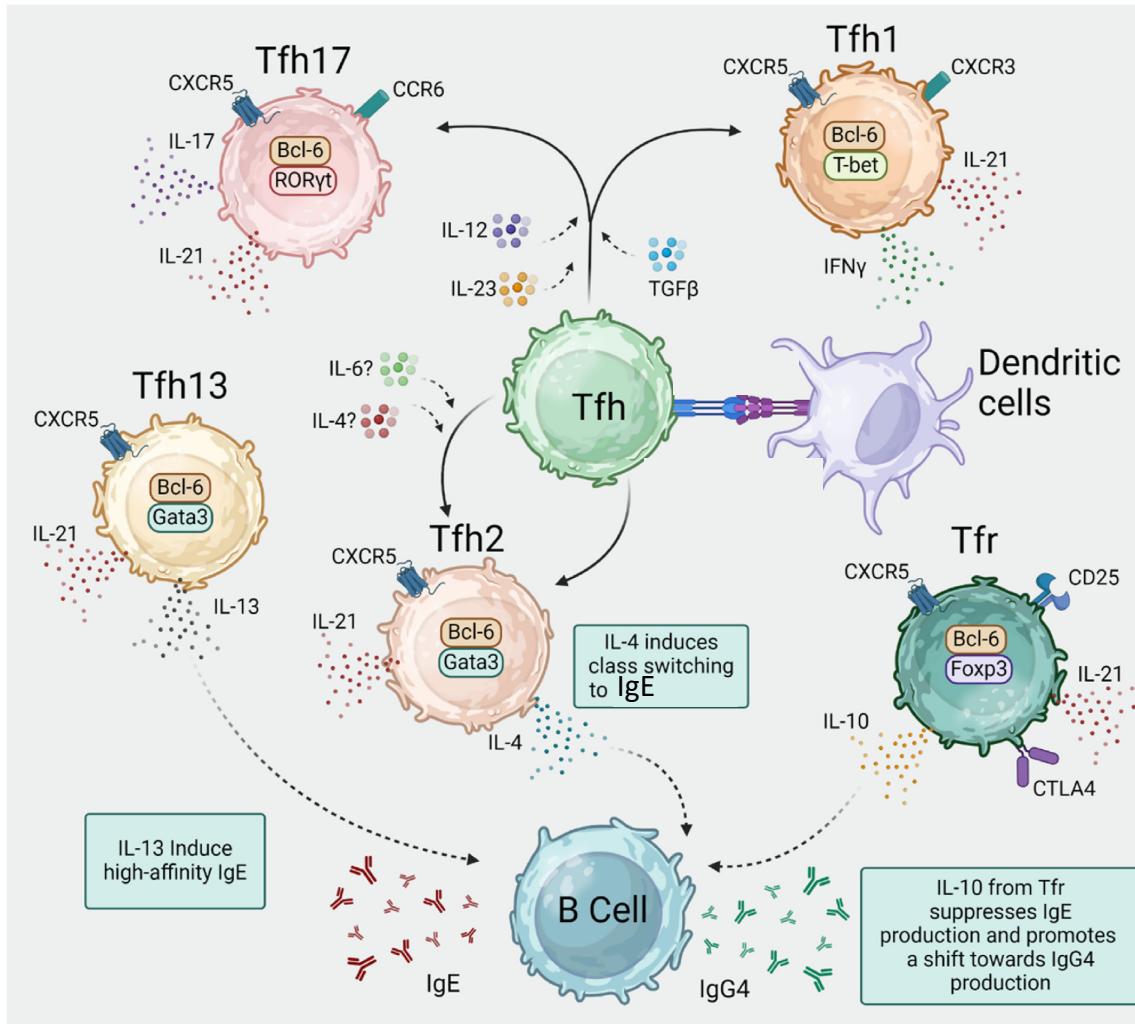
Le citochine avviano lo scambio di classe attivando la trascrizione dei trascritti germinativi.

In particolare l'IL-4 e l'IL-13 promuovono lo switch isotipico da IgM a IgE.



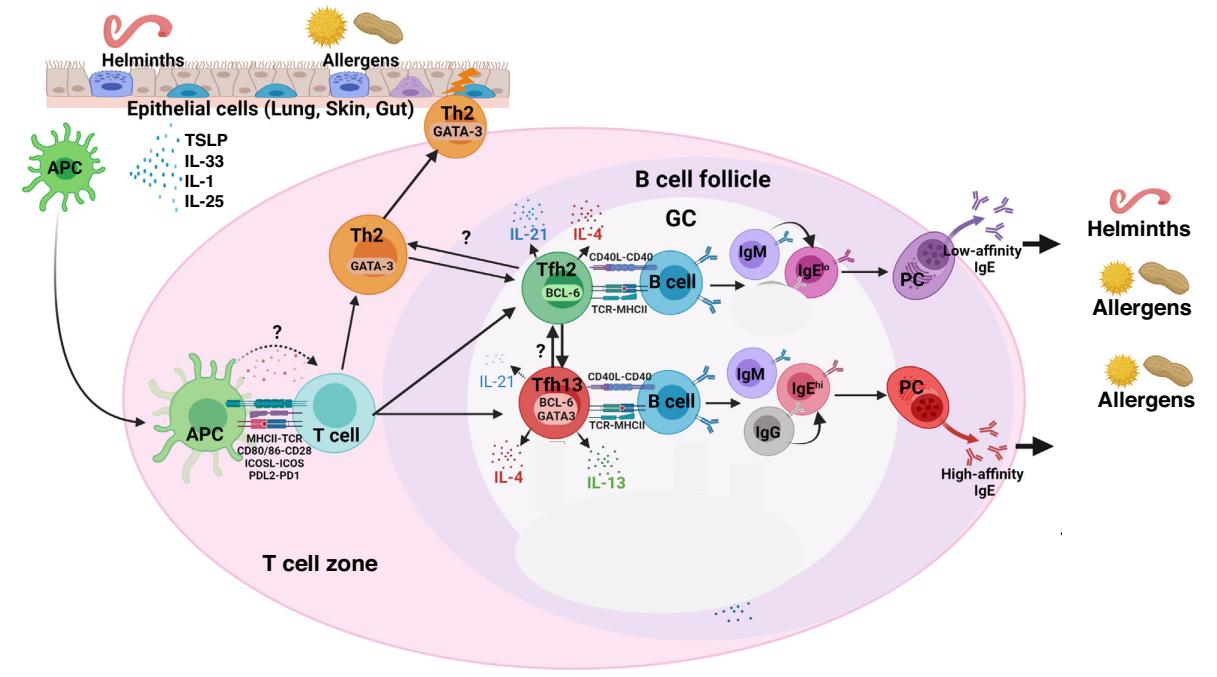
In seguito al legame dell'IL-4 o dell'IL-13 con i loro recettori vengono ingaggiate le JAK chinasi che fosforilano il fattore trascrizionale STAT6 che dimerizza e trasloca nel nucleo dove trascrive le sequenze I-S-C.

# Sottopopolazioni di linfociti Tfh nell'uomo



**Fig. 4.** Molecular characteristics of human Tfh subsets and their roles in inducing IgE and IgG4 production. Human Tfh subsets exhibit diversity and can be classified based on their molecular and functional characteristics. Some differentiation mechanisms of Tfh subsets have been elucidated. Tfh2, Tfh13, and Tfr subsets contribute to the induction of IgE- or IgG4-producing B cells.

# I linfociti Thelper follicolari allergene specifici inducono i linfociti B a produrre IgE specifiche per l'allergene

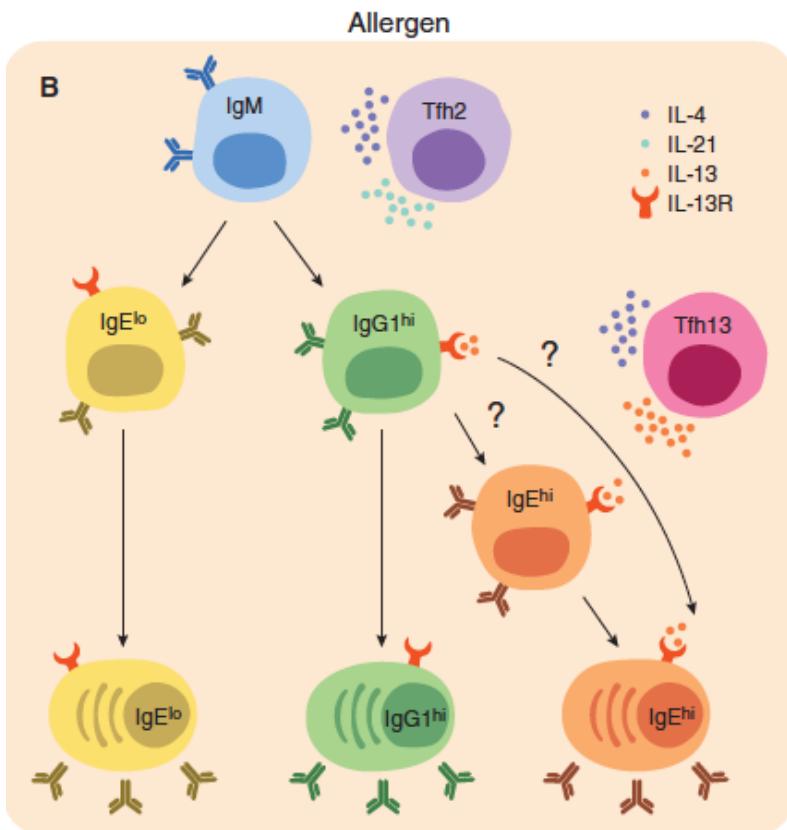


Current Opinion in Immunology

Studi recenti hanno dimostrato che la produzione di IgE anche in risposte fisiologiche come quelle verso gli elinti richiede le Tfh producenti IL-4 denominate Tfh2. La cooperazione da parte delle cellule Tfh2 producenti IL-4 promuove la produzione di IgE da parte dei linfociti B.

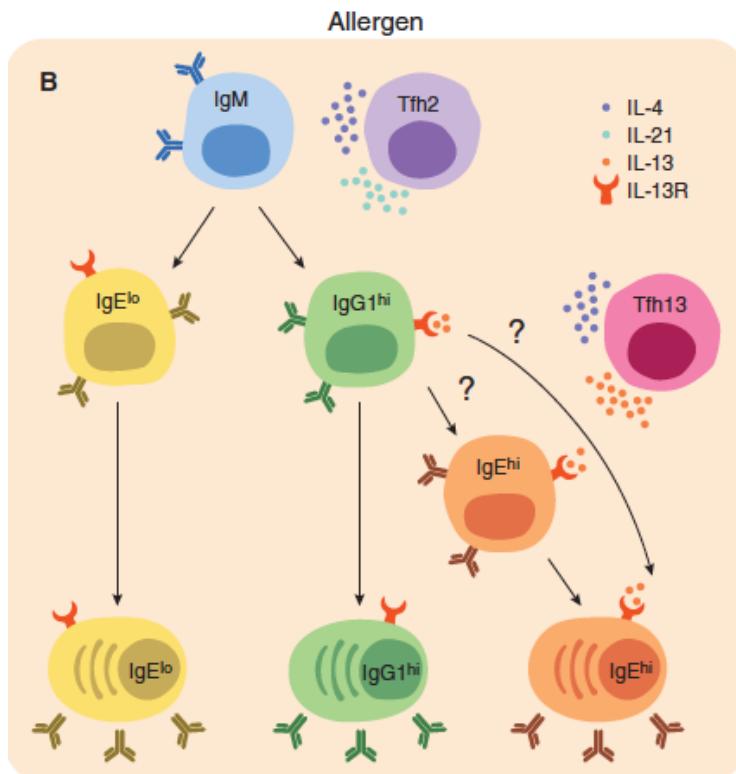
E' stato dimostrato che gli allergeni inducono IgE ad alta affinità che invece sono raramente prodotte nelle risposte fisiologiche.

## Modello dell'induzione di IgE durante l'esposizione all'allergene



Più recentemente è stata identificata una popolazione di Tfh producenti IL-4 e IL-13 ed esprimenti GATA3 e BCL6 denominata Tfh13. La perdita di tali cellule nel modello murino determina un difetto nella induzione di IgE allergene specifiche. Attualmente è stato proposto che le Tfh2 medianano lo switch verso IgE a bassa affinità mentre le Tfh13 medianano lo switch verso le IgE ad alta affinità.

## Modello dell'induzione di IgE durante l'esposizione all'allergene



Mentre l'IL-4 media lo switch dell'immunoglobulina diretto da IgM a IgE, l'IL-13 potrebbe essere coinvolta nello switch sequenziale da IgM a IgG1 e poi da IgG1 a IgE. Lo switch sequenziale IgG1 → IgE determina la generazione di IgE ad alta affinità che sono indotte dagli allergeni.

## **Caratteristiche delle risposte IgE**

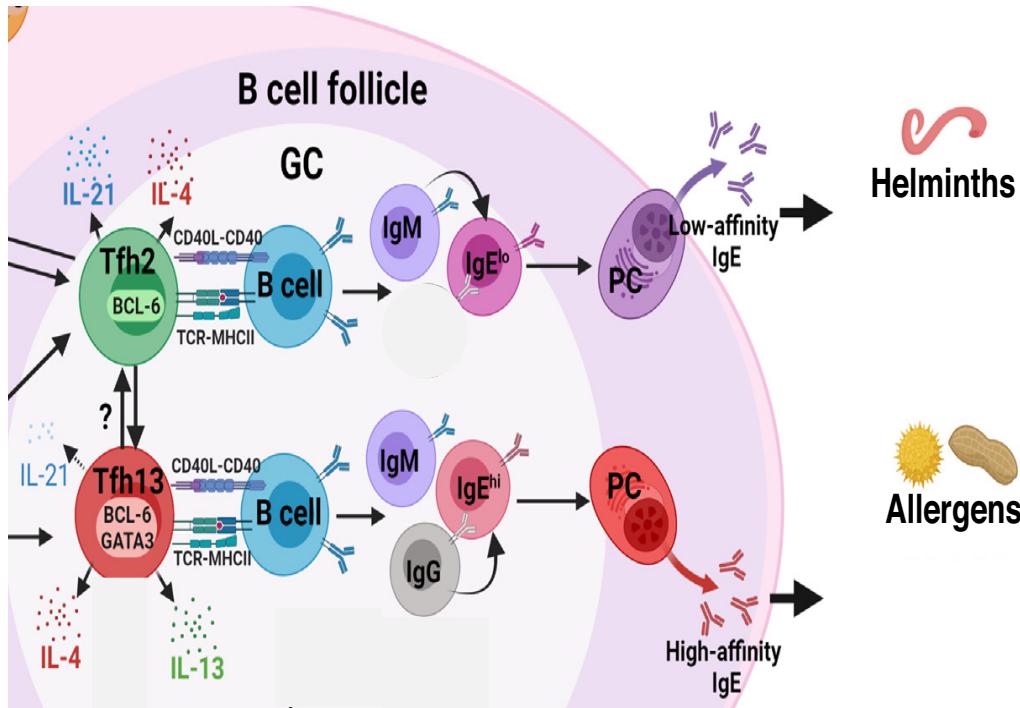
Le cellule IgE+ nel centro germinativo sono rare

Lo switch a IgE avviene nel CG ma la maggior parte delle cellule B IgE+ differenziano in plasmacellule che lasciano il CG.

Le IgE con aumento della affinità avviene attraverso uno switch sequenziale da IgM a IgG e poi a IgE. Lo switch diretto IgM-IgE genera IgE a bassa affinità.

Cellule B della memoria IgE sono rare. In seguito a re-incontro con l'antigene le cellule B della memoria IgG1 differenziano in plasmacellule secernenti IgE.

# Produzione di IgE nella fase di sensibilizzazione



Nella fase di sensibilizzazione sono generate sia Tfh2 che Tfh13. Queste ultime sono unicamente indotte nelle condizioni allergiche.