

Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

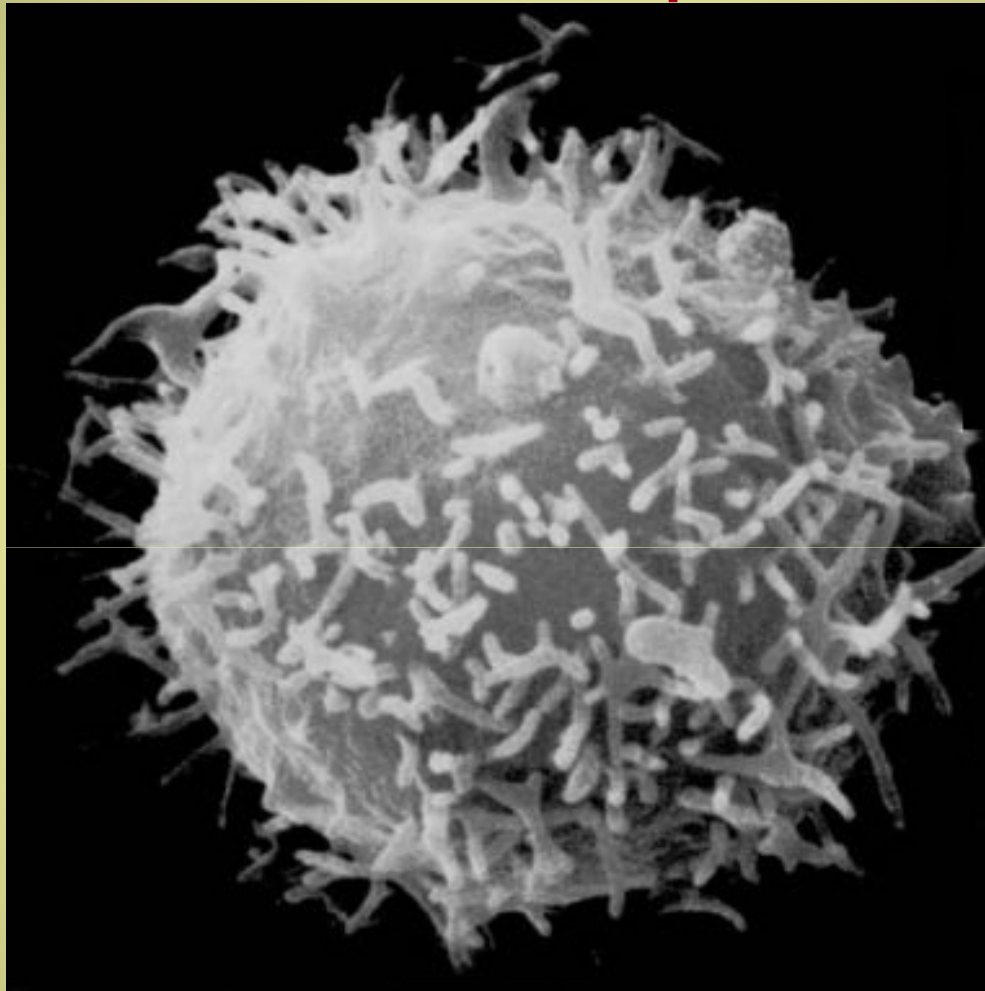
Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺**

Il linfocita T:

La cellula chiave della risposta immunitaria



L'assenza o l'iperattività porta ad una patologia

I linfociti T

● Le cellule T hanno un ruolo importante nell'eliminazione delle cellule neoplastiche/trapiantate e di molti agenti patogeni, quali:

- ✓ Virus.
- ✓ Batteri intracellulari.
- ✓ Parassiti unicellulari.

I linfociti T

- Mediano la risposta cellulo-mediata e rispondono ai frammenti peptidici degli Ag proteici assemblati alle molecole MHC di classe I/II e presentati dalle cellule APC e/o dalle cellule bersaglio
- Il recettore che riconosce il complesso MHC/Ag prende il nome di recettore dei linfociti T (TCR) e i segnali biochimici che seguono al riconoscimento dell'Ag sono trasdotti da altre molecole dette CD3 e ζ .
- Il linfocita T esprime altre molecole che non partecipano alla risposta verso gli Ag e sono dette “molecole accessorie”

Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e del CD3, delle molecole ζ , del CD4 e del CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺

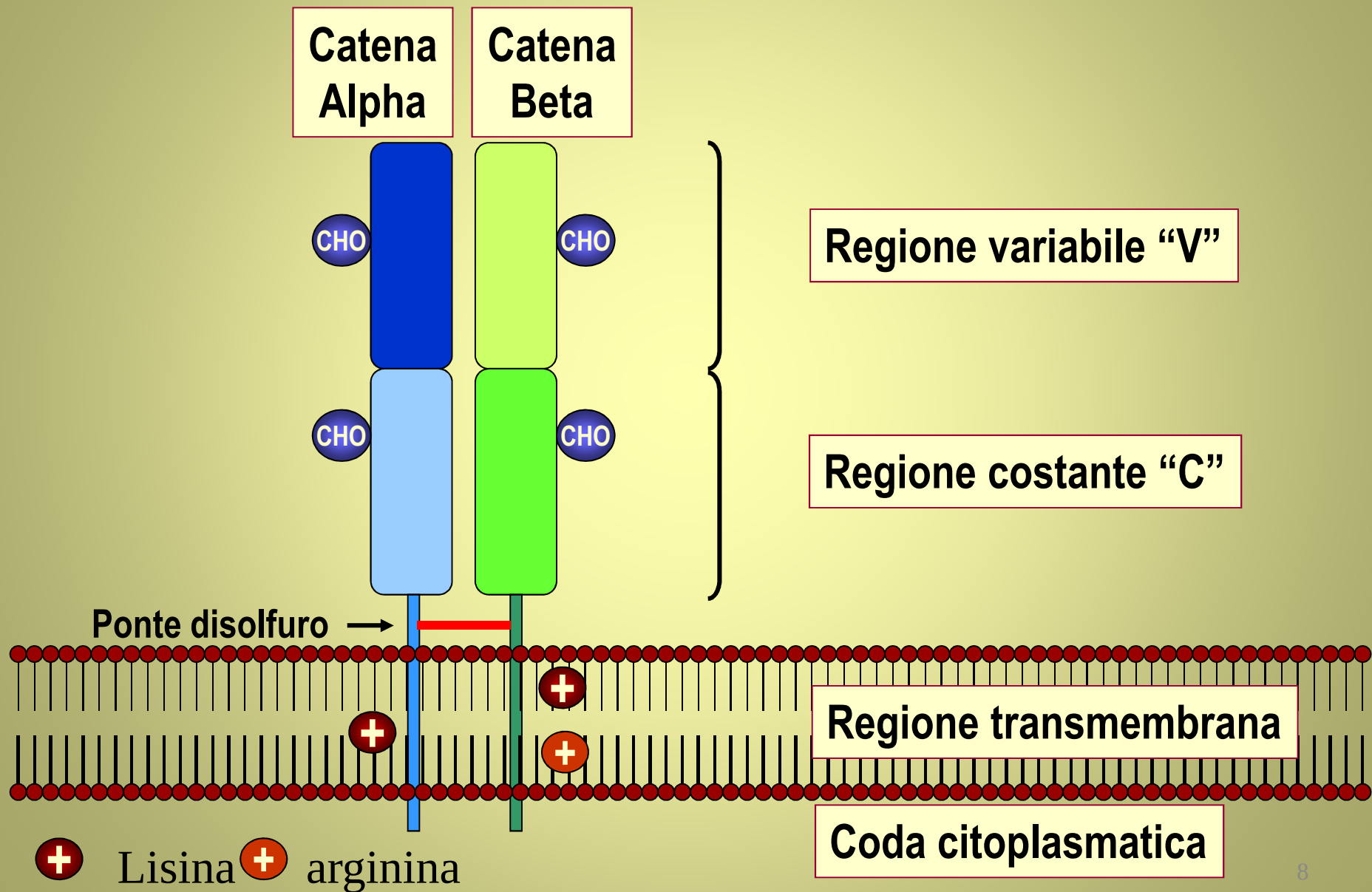
T Cell Receptor (TCR)

- Il TCR dei linfociti T helper (CD4) e citotossici (CD8) è un eterodimero, formato dalle catene α e β .
- Ogni clone di cellule T esprime un TCR con un'unica specificità.
- Possono esserci da 10^{15} a 10^{18} cloni di cellule T con differenti TCR generati dai riarrangiamenti dei segmenti V(D)J, come per le Ig.

Struttura del T Cell Receptor (TCR)

- Le due catene α e β sono di uguale lunghezza
- Ogni catena consiste di una regione variabile (V) e una costante (C)
- Una piccola popolazione di cellule T ha un TCR con catene γ e δ . Il TCR $\gamma\delta$ ha specificità differenti dal TCR $\alpha\beta$

Struttura del TCR α/β



Struttura del TCR α/β e $\gamma\delta$

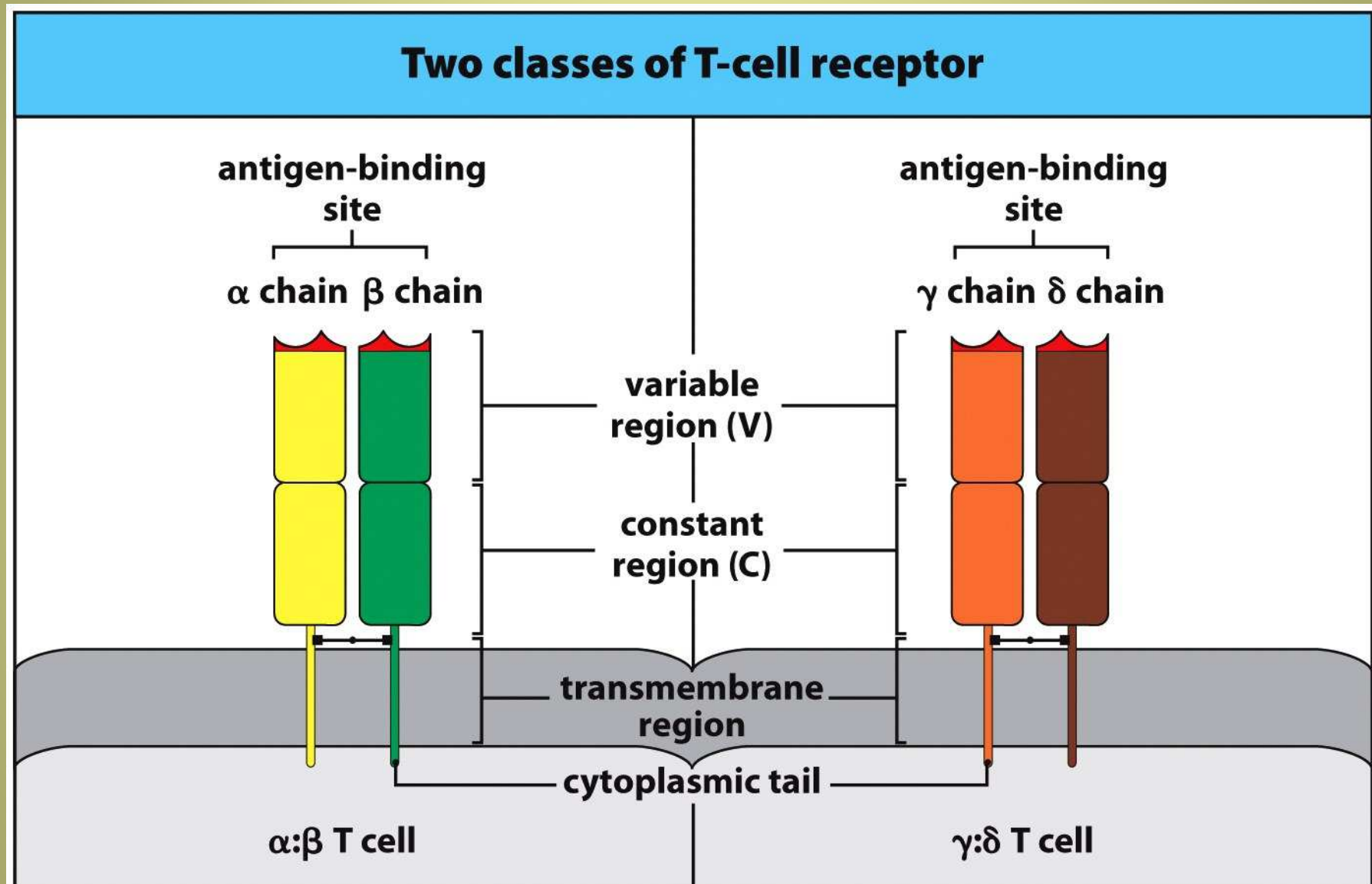


Figure 5.7 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

T Cell Receptor Complex

- Le catene α e β del TCR sono espresse sulla superficie delle cellule T insieme al complesso **CD3** ed a due catene identiche ζ (zeta).
- Il CD3 e la catena ζ non legano l'Ag, ma trasducono il segnale di attivazione.

Il complesso CD3 e le catene ζ

❑ Molecole:

CD3: 4 proteine (1 γ , 1 δ , 2 ϵ)

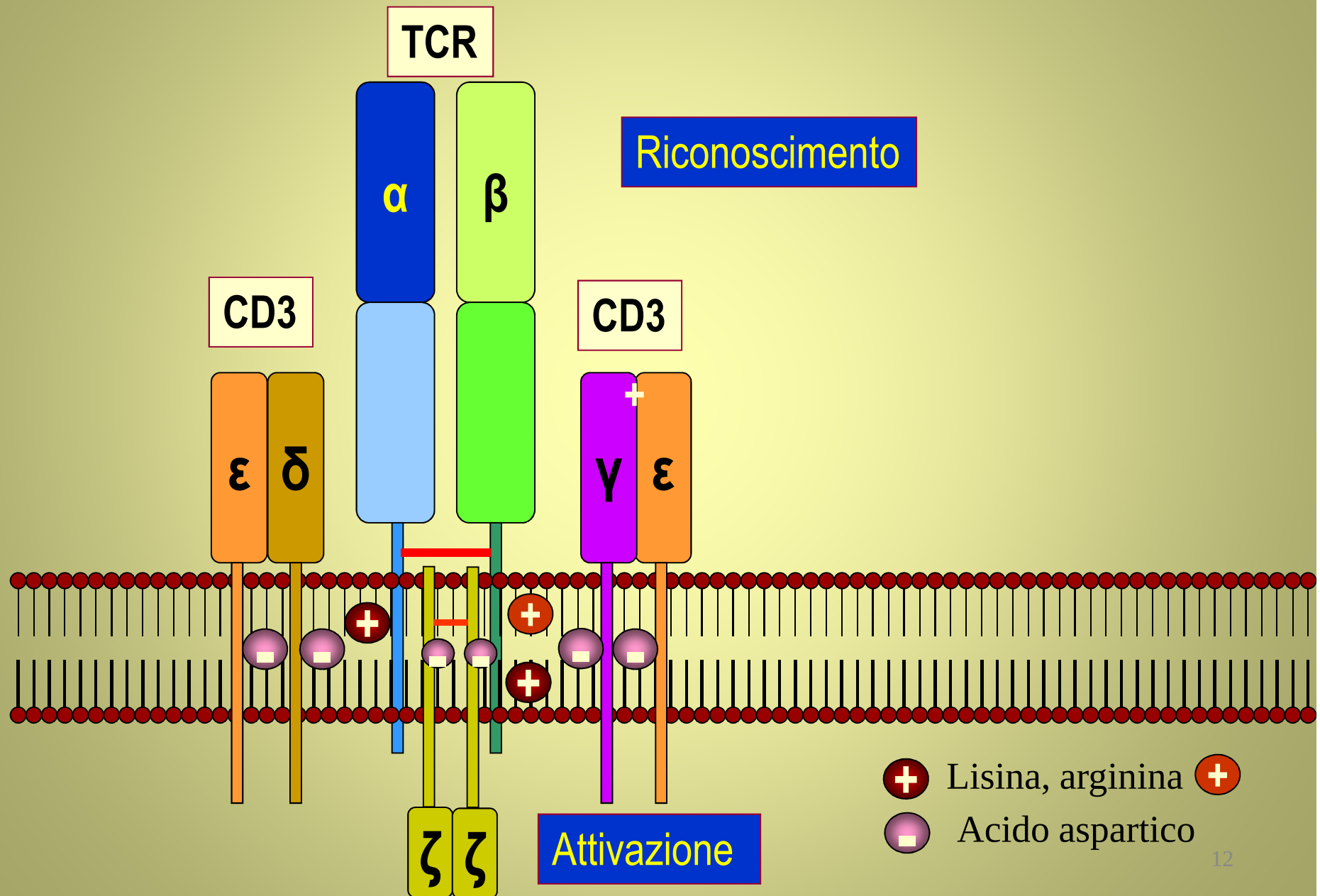
Catena ζ : due proteine identiche

Sono sintetizzate ed espresse insieme al TCR, necessarie per l'espressione del TCR in superficie;

❑ Funzione:

Trasducono il segnale di attivazione quando il TCR riconosce il complesso MHC-peptide

T Cell Receptor Complex



Co-recettori

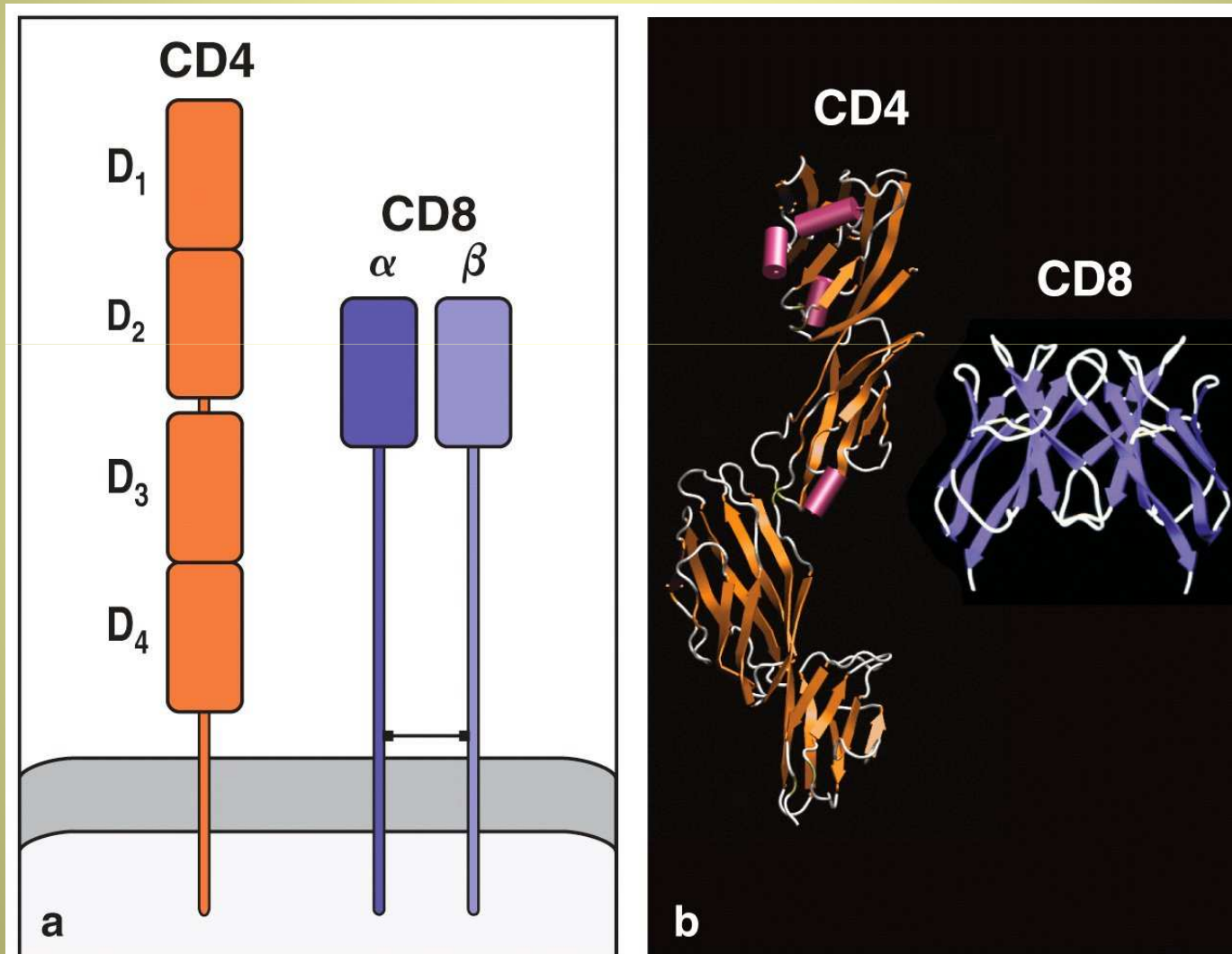


Figure 3-15 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Co-recettori e Molecole accessorie implicate nell'interazione Cellula-Cellula

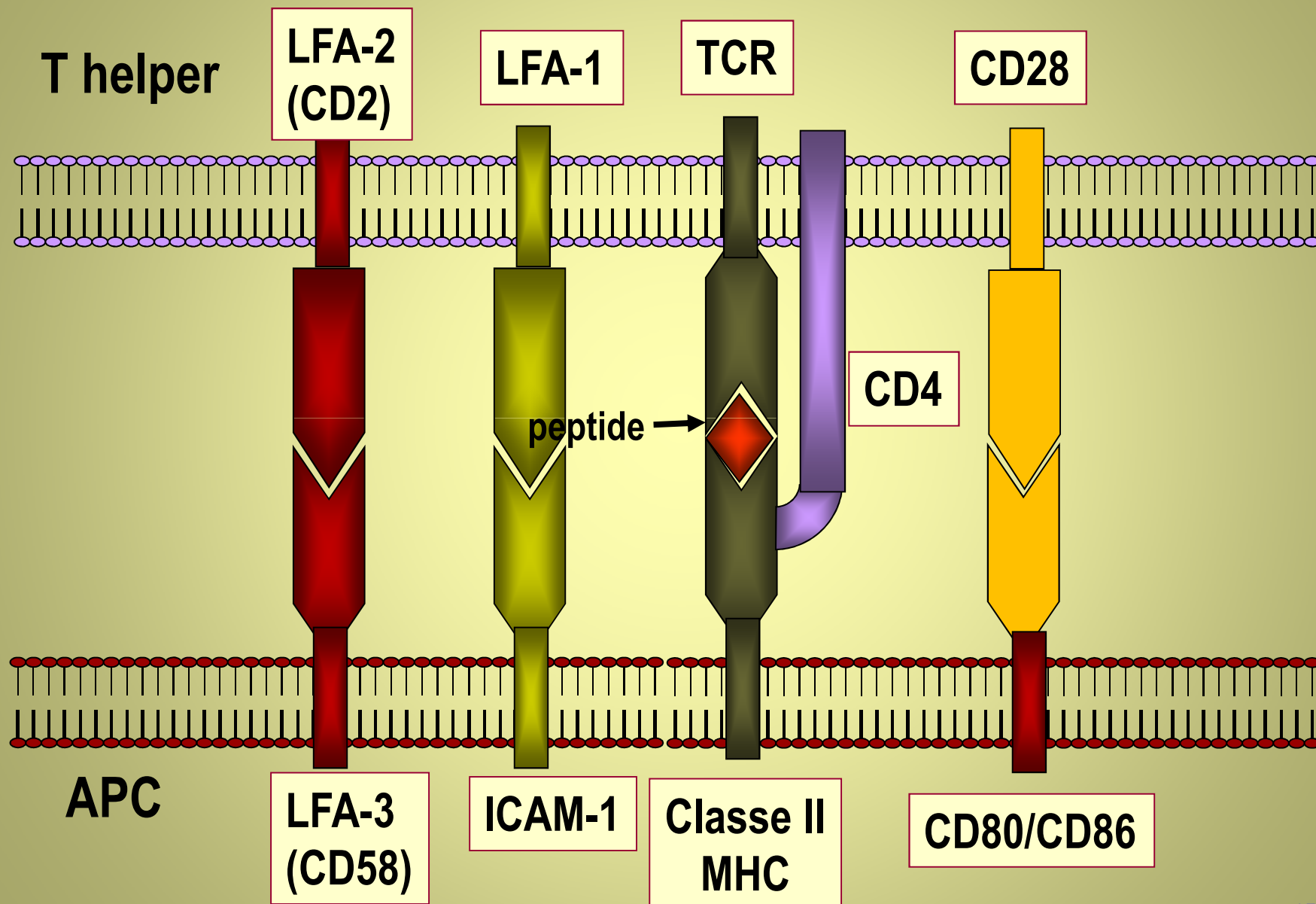
Sono molecole espresse dalla cellula T che interagiscono con i ligandi espressi dalla cellula APC/target quando il TCR riconosce il complesso MHC-peptide

- | <u>Cellula T</u> | <u>Ligandi su APC/target</u> |
|------------------|------------------------------------|
| • CD4 | classe II MHC (dominio $\beta 2$) |
| • CD8 | classe I MHC (dominio $\alpha 3$) |
| • CD2 (LFA-2) | LFA-3 (CD58) |
| • LFA-1 | ICAM-1, ICAM-2 |
| • CD28 | CD80, CD86 |

LFA = Leukocyte Function-associated Antigen

ICAM = InterCellular Adhesion Molecule

Interazione tra Th ed APC



Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

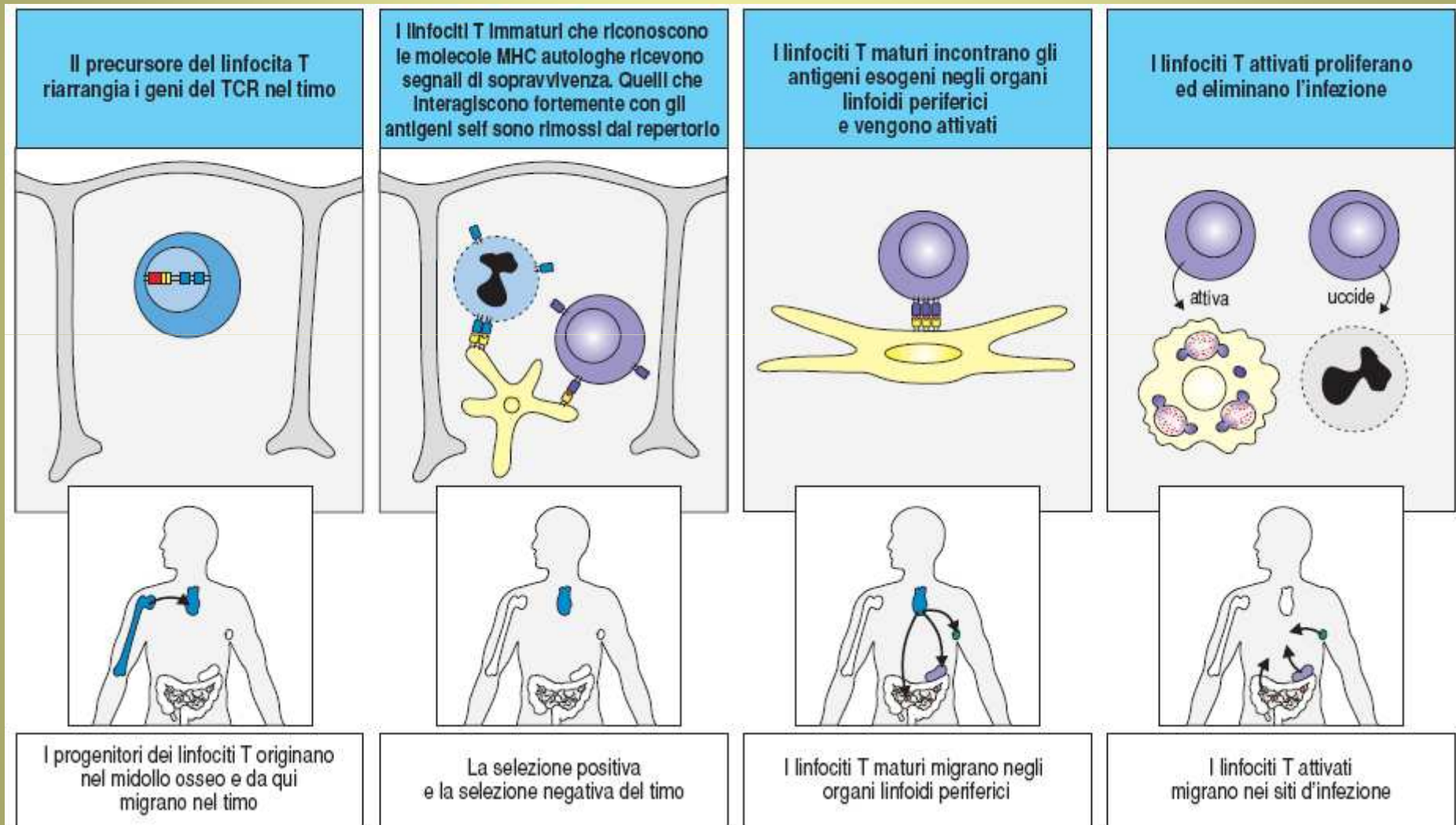
Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:

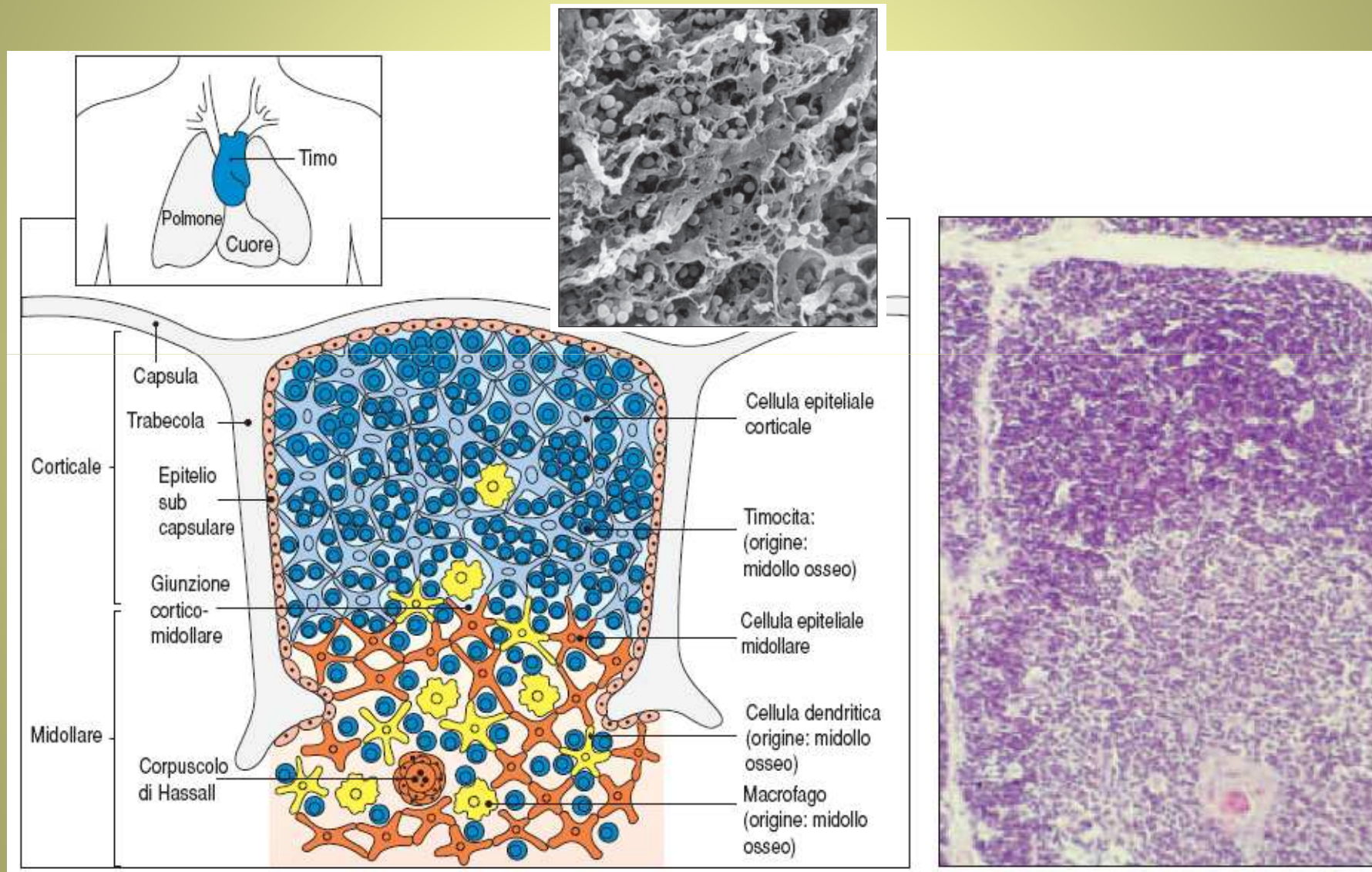
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺

Dalla cellula staminale unipotente alla due cellule T



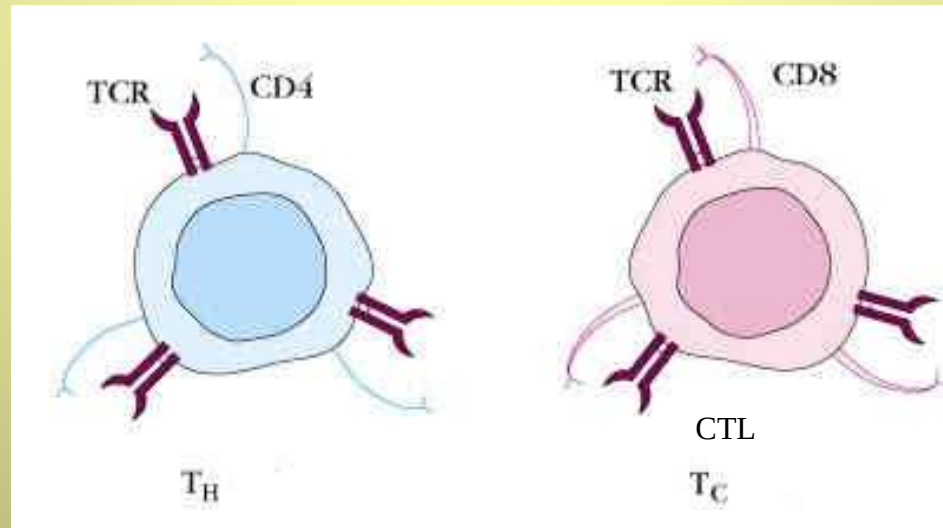
Struttura del timo:

Le cellule epitelio-reticolari controllano la maturazione delle cellule T



Funzione del timo

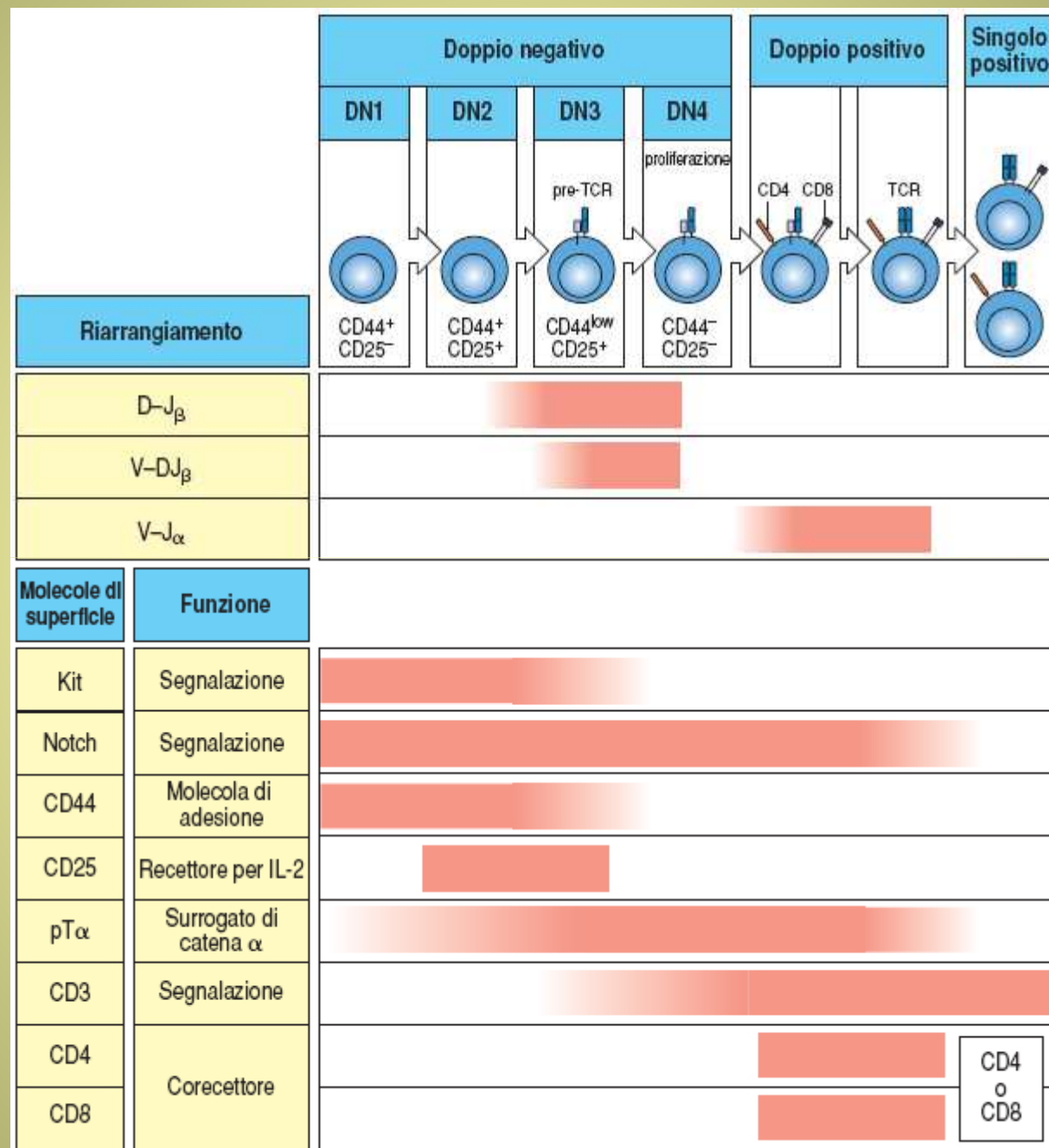
- ❖ acquisizione del recettore per l'antigene (TCR), del CD3, delle catene ζ e dei due corecettori $CD4^+$ e $CD8^+$
- ❖ acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self
- ❖ differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
T helper (Th) $CD4^+$ e T citotossici (CTL) $CD8^+$



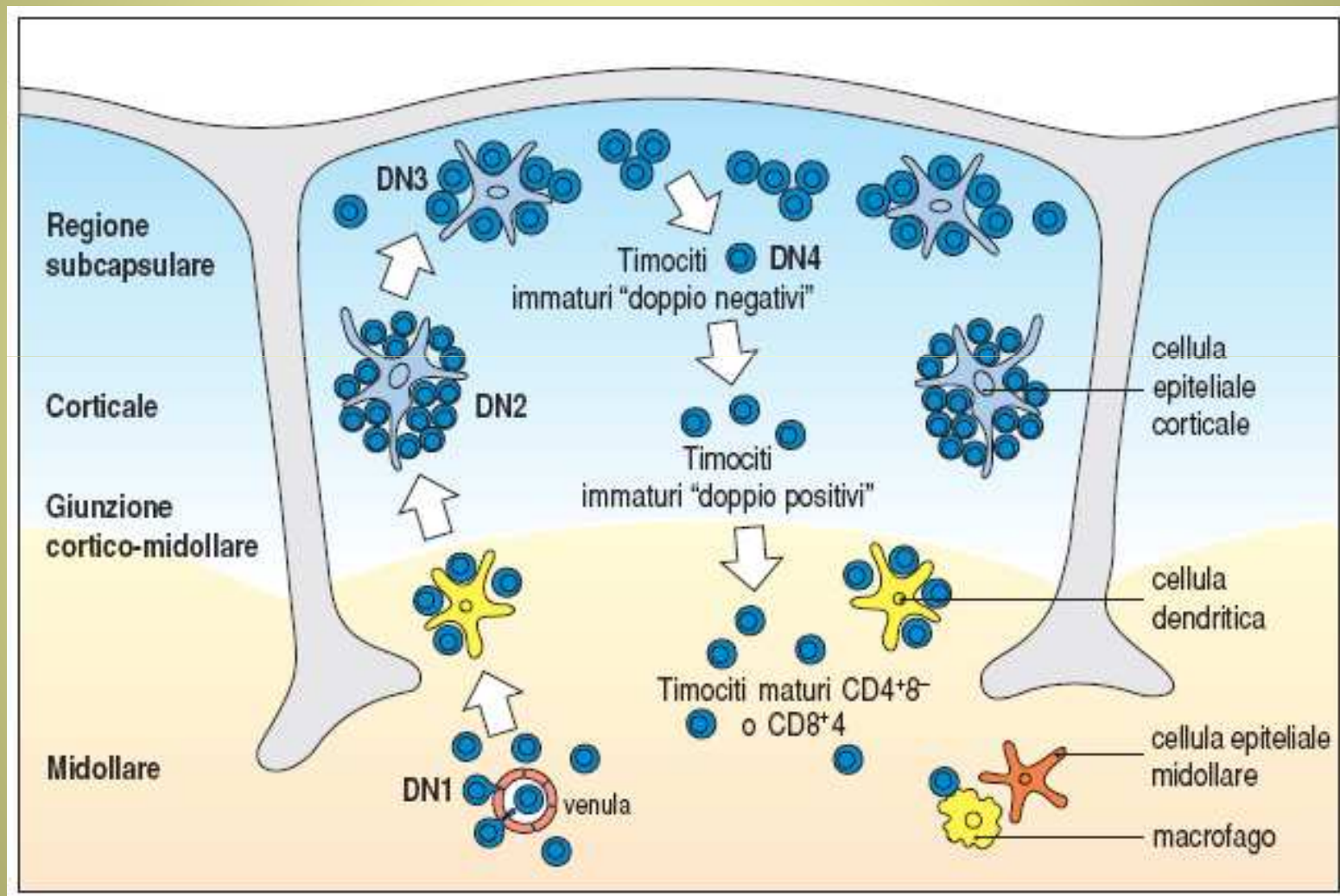
PROCESSO DI MATURAZIONE

La maturazione dei linfociti T (timociti) è studiata analizzando l'espressione delle molecole $CD4^+$ e $CD8^+$. In base alla assenza/presenza sulla loro membrana dei due marcatori fenotipici, i timociti possono essere suddivisi in quattro sottopopolazioni:

- cellule doppio-negative, DN (assenza del $CD4^+$ e $CD8^+$)
- cellule doppio-positive, DP (espressione contemporanea del $CD4^+$ e $CD8^+$)
 - cellule singolo-positive (SP) $CD4^+$
 - cellule singolo-positive (SP) $CD8^+$



Localizzazione nel timo delle sottopopolazione dei timociti



**Molte cellule
non riescono a
completare la
maturazione**

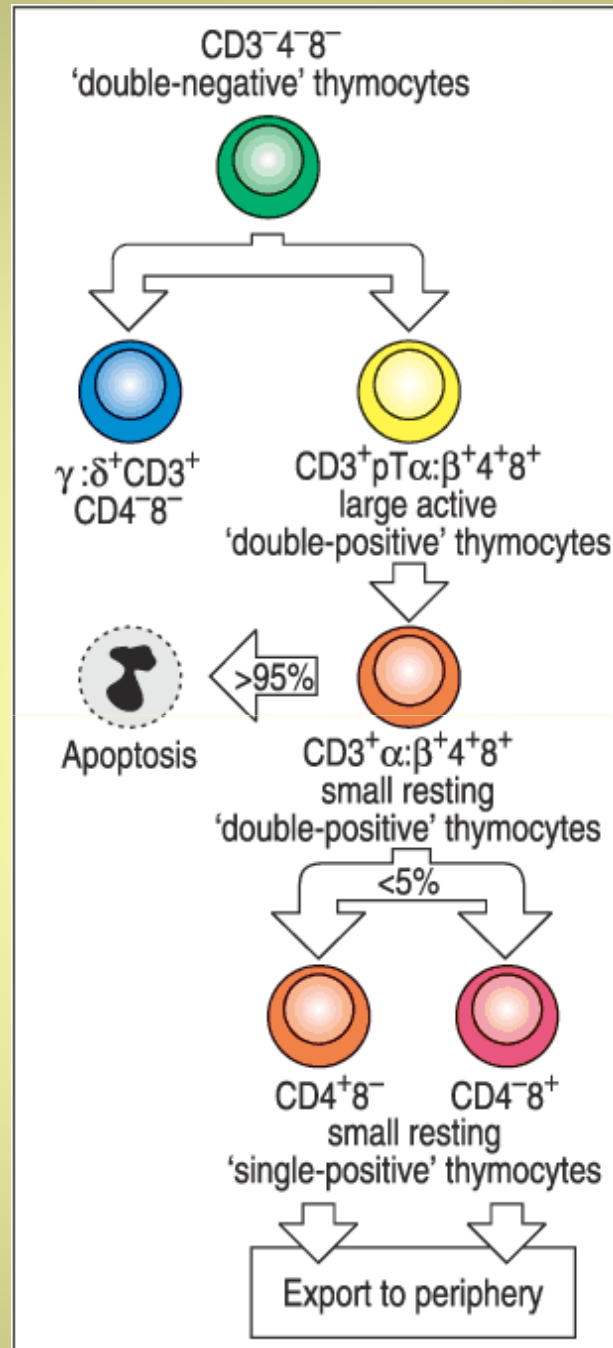


Fig 7.11 © 2001 Garland Science

Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

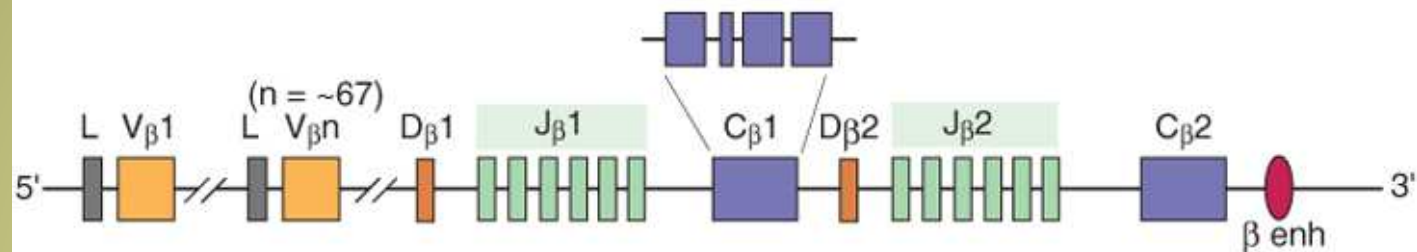
**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺**

Famiglie multigeniche del TCR nell'uomo

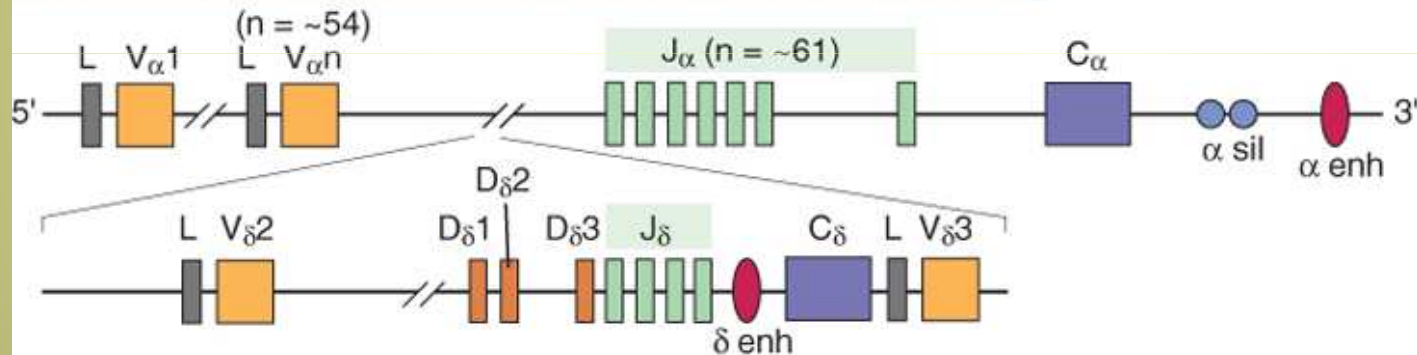
Gene	cromosomi	N° dei segmenti genici			
		V	D	J	C
α Chain	14	50		70	1
δ Chain	14	3	3	3	1
β Chain	7	57	2	13	2
γ Chain	7	14		5	2

Localizzazione dei geni α , β , γ e δ

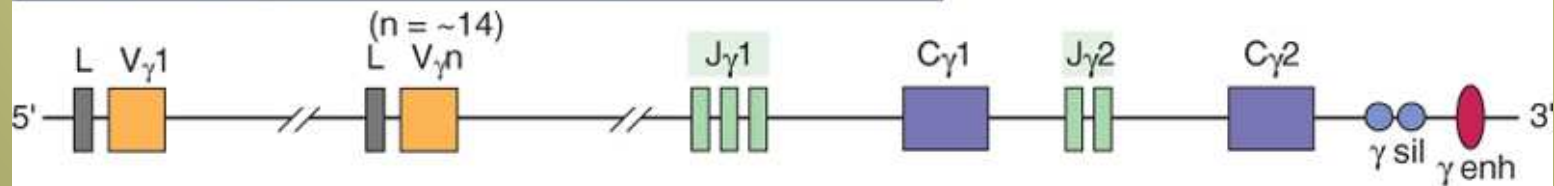
Human TCR β chain locus (620 kb; chromosome 7)



Human TCR α , δ chain locus (1000 kb; chromosome 14)

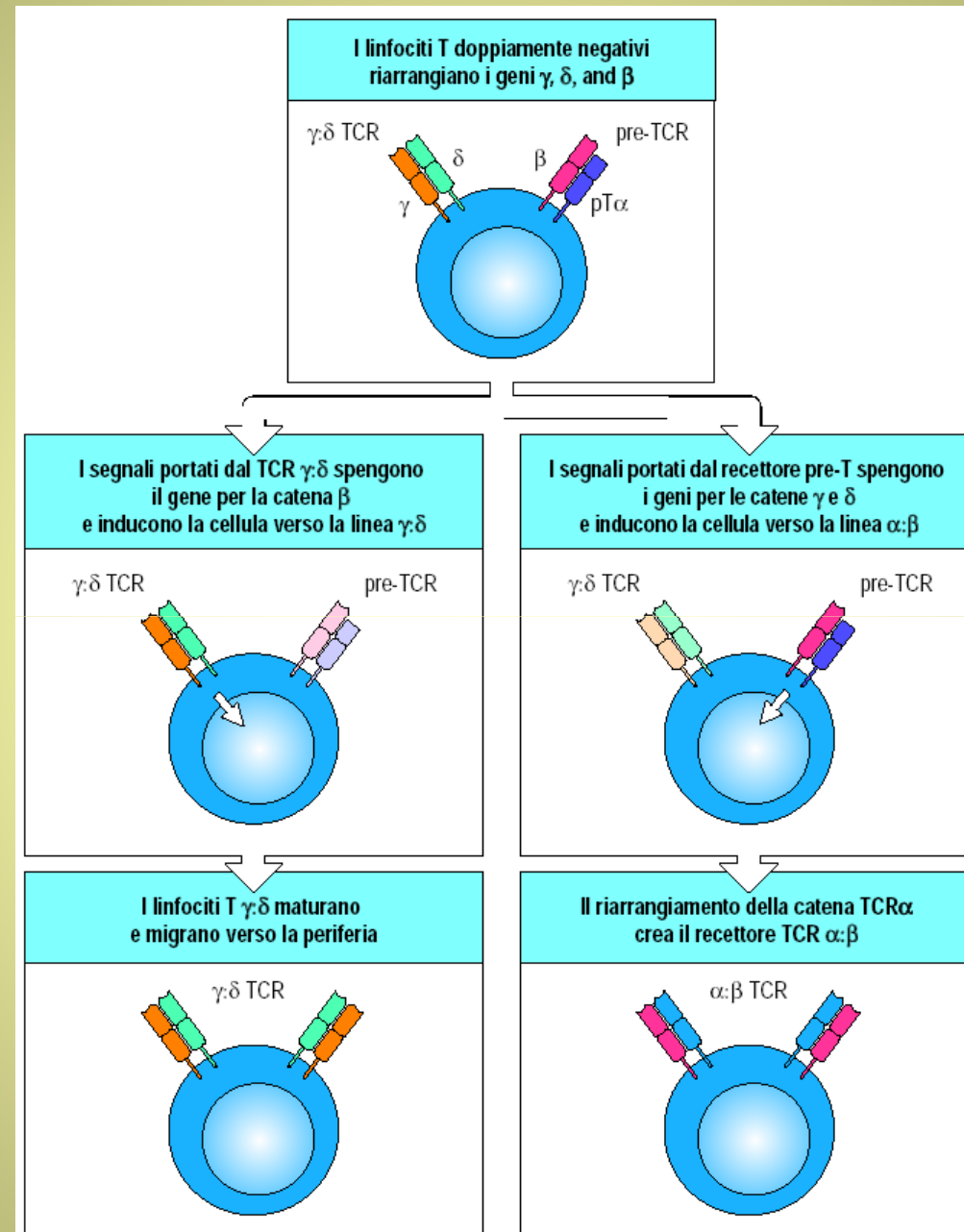


Human TCR γ chain locus (200 kb; chromosome 7)



Maturazione linfociti T

- La maturazione delle cellule T avviene attraverso due possibili vie.
 - 1. in una percentuale minore (10%) i timociti esprimono le catene $\gamma\delta$ e danno origine a cellule T DN CD3⁺ TCR $\gamma\delta$).
 - 2. In maggioranza (90%) i timociti esprimono le catene $\alpha\beta$ e danno origine a cellule DP CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ che esprimono ambedue i co-recettori CD4 e CD8.
 - Il 95% dei timociti non si matura e muore per apoptosi durante i due processi di selezione timica
- I timociti DP procedono nella maturazione dando origine alle cellule SP CD4⁺ (10%) o CD8⁺ (5%).



Cellule T $\gamma\delta$

- Costituiscono la maggioranza delle cellule T dell'epidermide, “Dendritic Epidermal cells (DEC o dETC)”, dell'epitelio intestinale, “Intestinal Epithelial lymphocytes (IEL)” e dell'epitelio polmonare.
- Rappresentano un importante punto di transizione tra l'immunità innata e quella acquisita costituiscono una prima linea di difesa per la protezione delle superfici epiteliali contro diversi patogeni

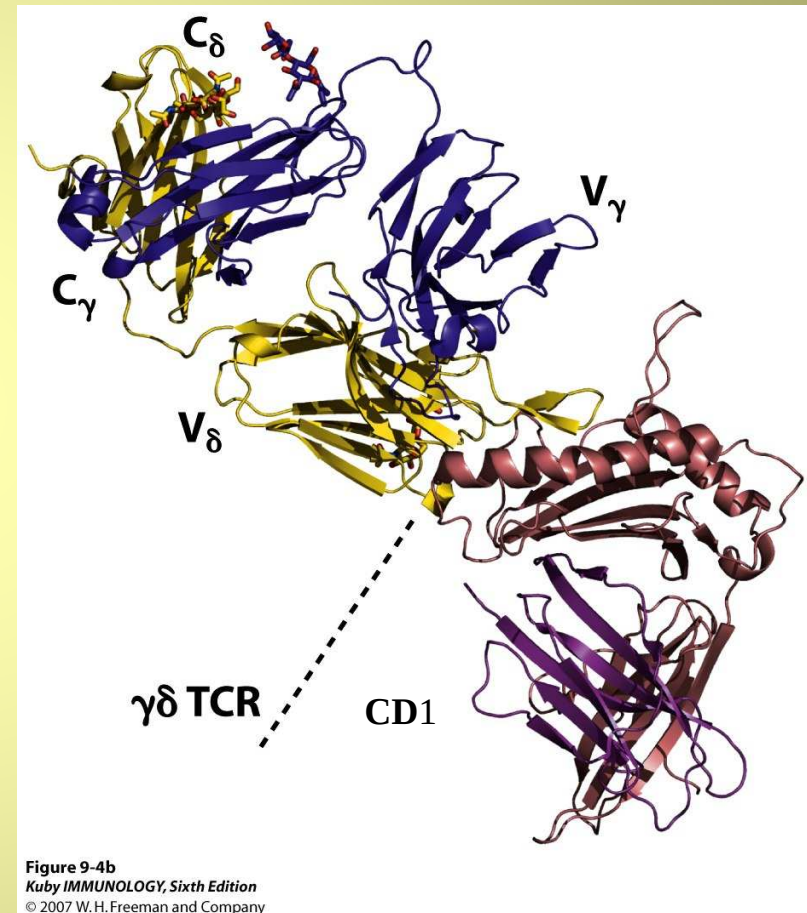
Antigen recognition by $\gamma\delta$ T cells is different than $\alpha\beta$ T cells

$\gamma\delta$ T cells are not MHC restricted!
CD1

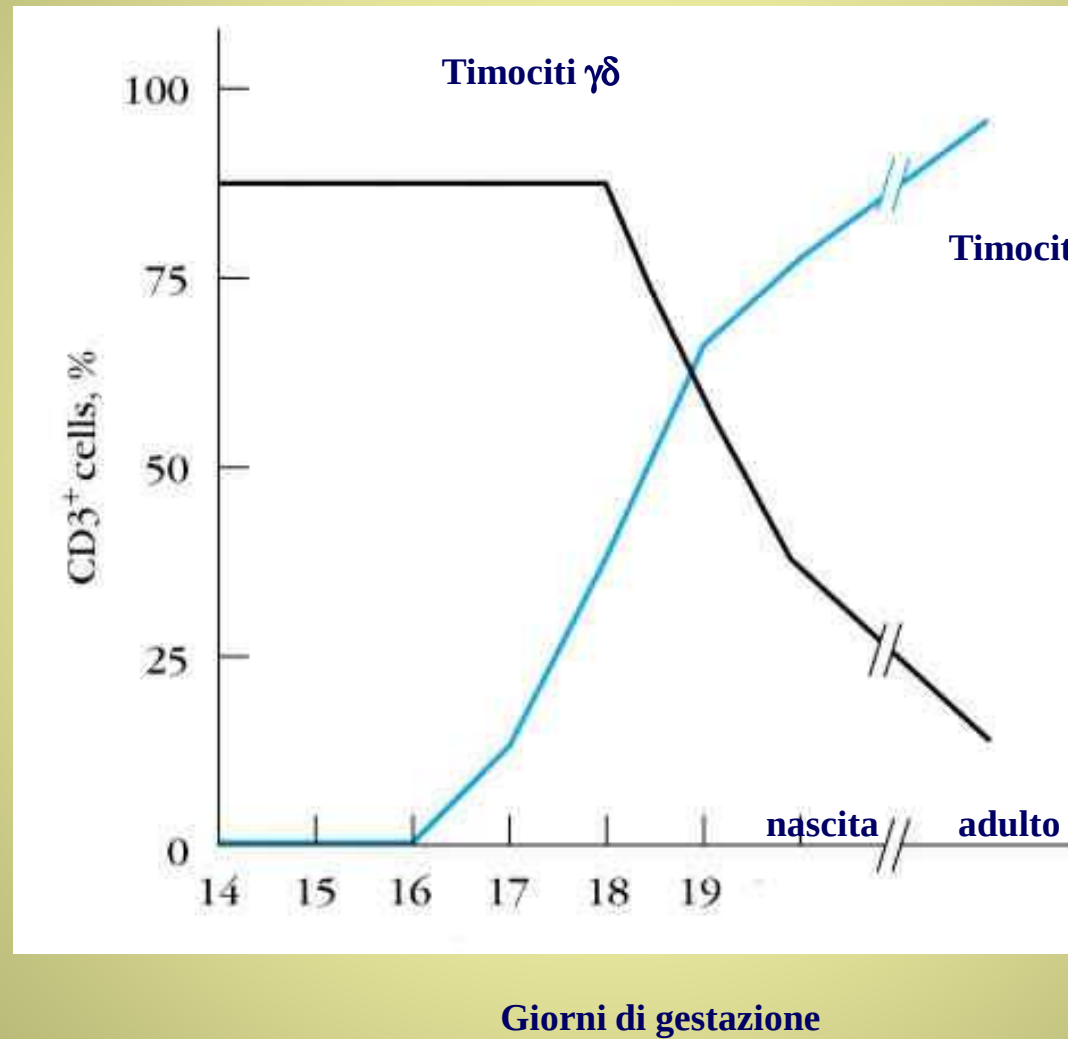
Antigen is recognized directly,
more like an antibody

In some cases the ligands for the
 $\gamma\delta$ TCR are self proteins
upregulated under stress
conditions

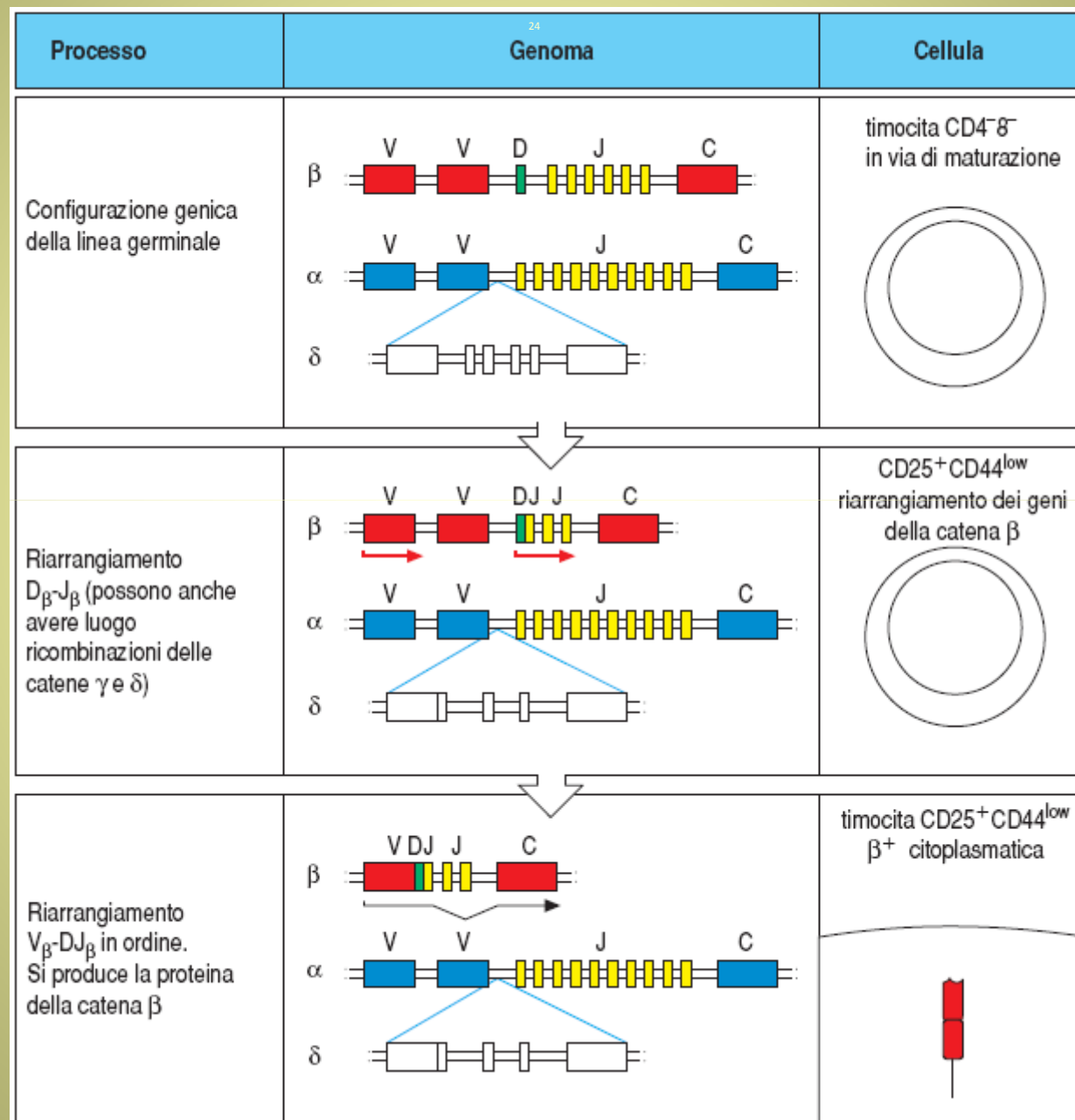
In humans, circulating $\gamma\delta$ cells
recognize an phospholipid
antigen from *Mycobacterium*
tuberculosis



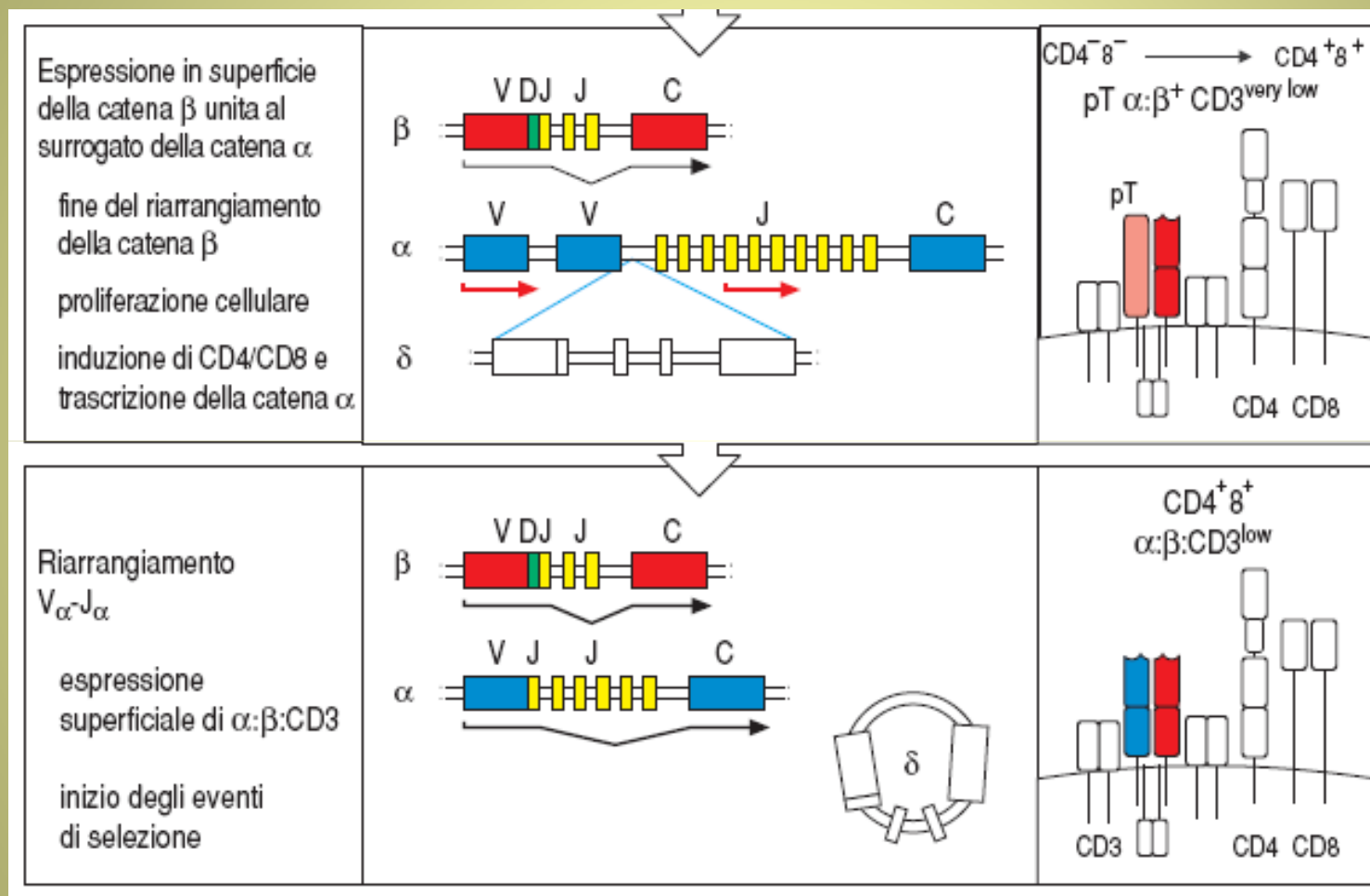
Cinetica della comparsa dei timociti $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ nel timo



I diversi stadi del riarrangiamento genico dei linfociti $\alpha\beta$ (a)



I diversi stadi del riarrangiamento genico dei linfociti $\alpha\beta$ (b)



TCR β locus has two D-J clusters

Allows a 2nd rearrangement if 1st is nonproductive

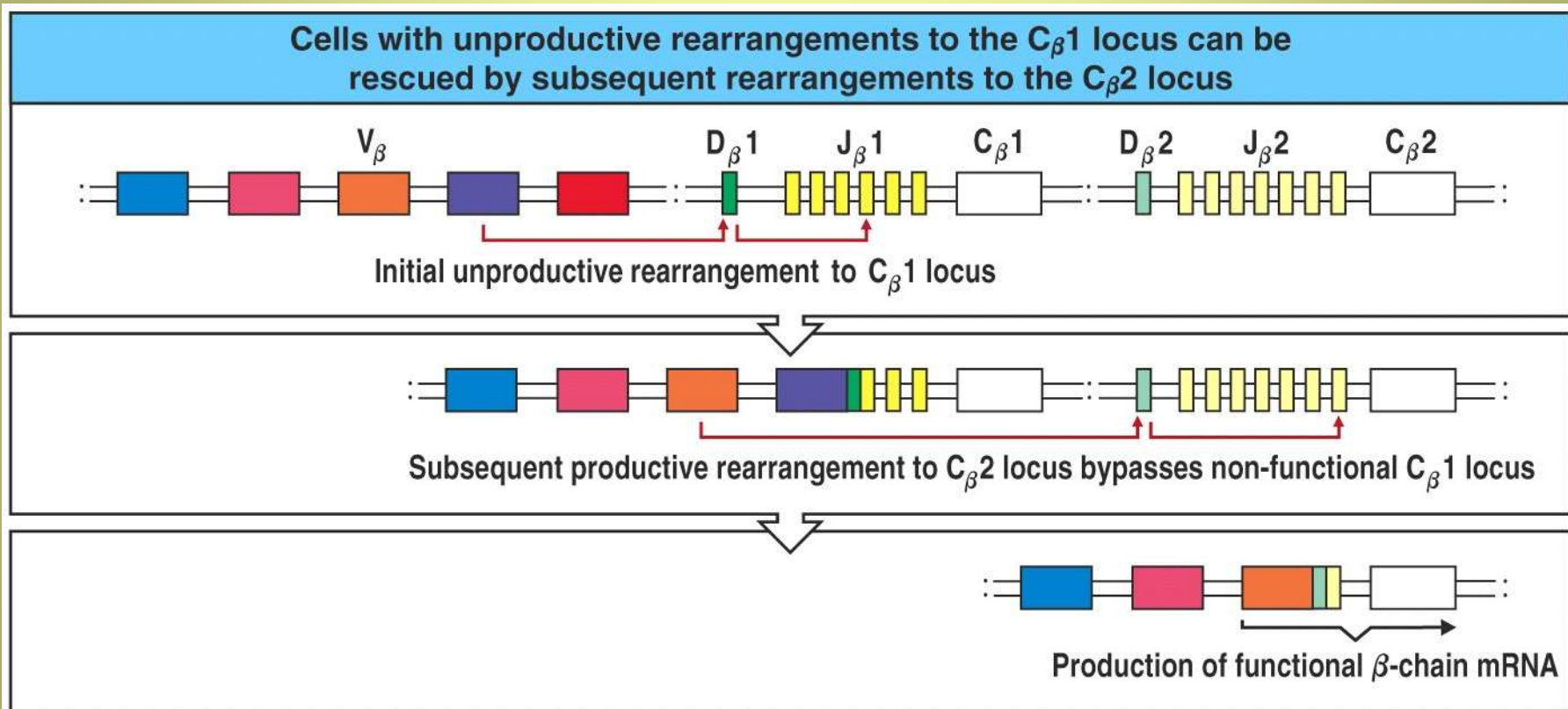
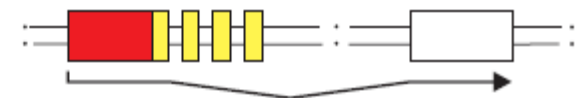
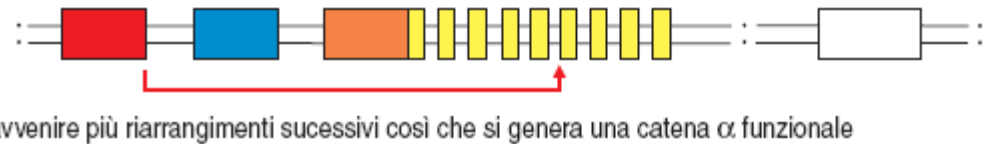
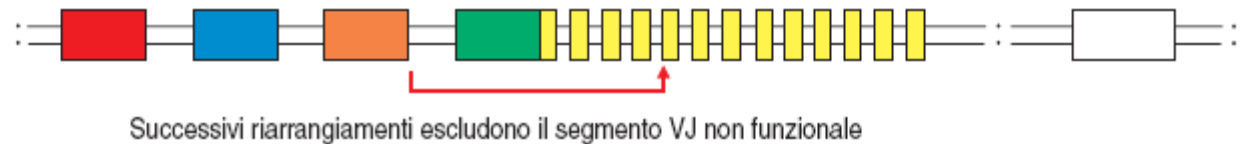
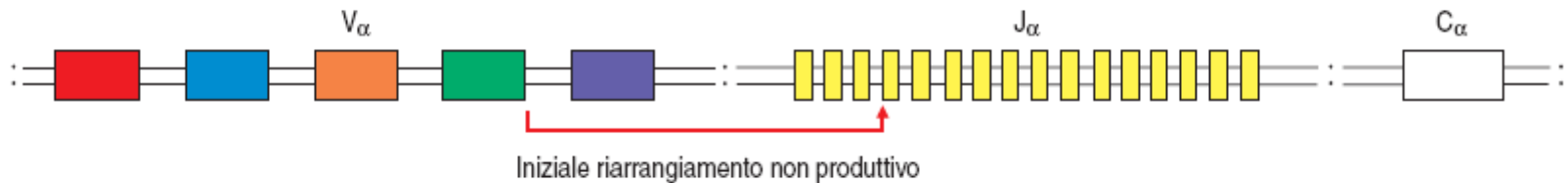


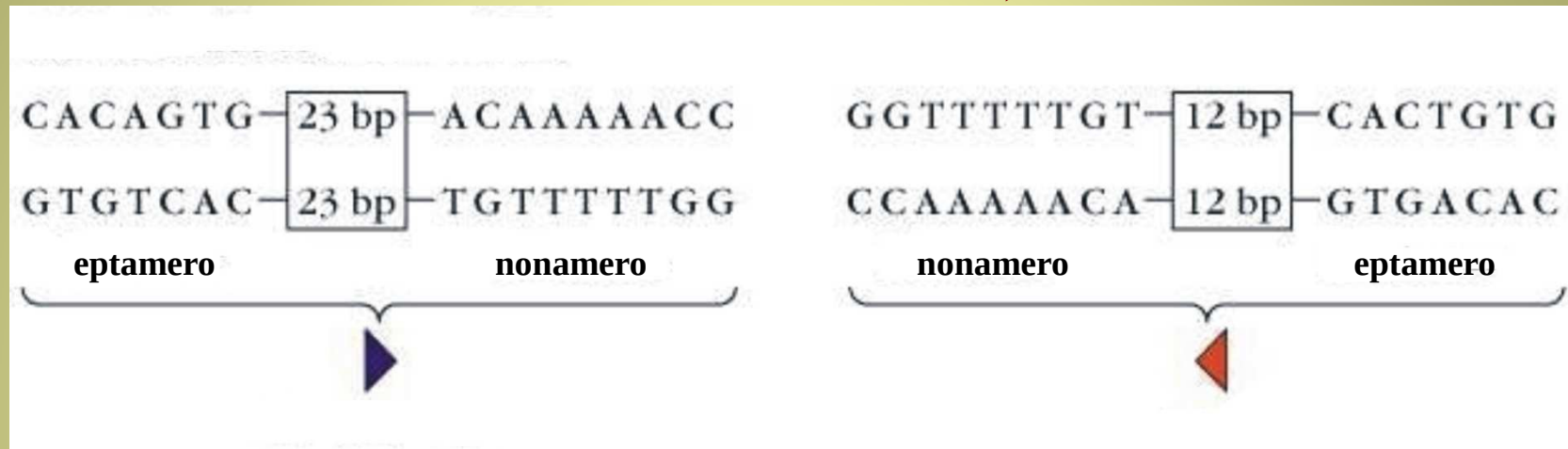
Figure 5-7 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

I segmenti genici α possono subire più riarrangiamenti che possono verificarsi in ambedue i cromosomi

Riarrangiamenti ripetuti possono recuperare cellule con giunzioni non produttive $V_{\alpha}J_{\alpha}$



Sequenza nucleotidica delle RSS (sequenze segnale di ricombinazione)



RSS a due giri

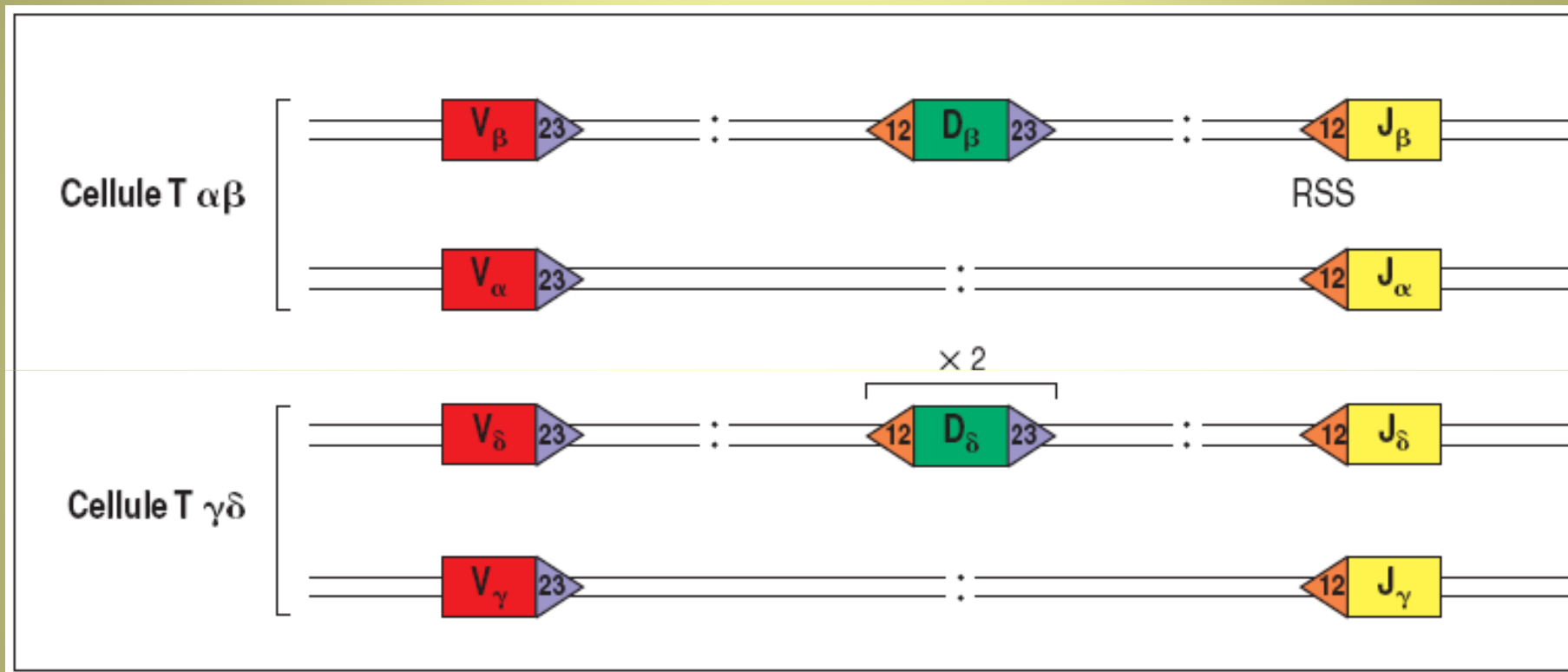
RSS a un giro

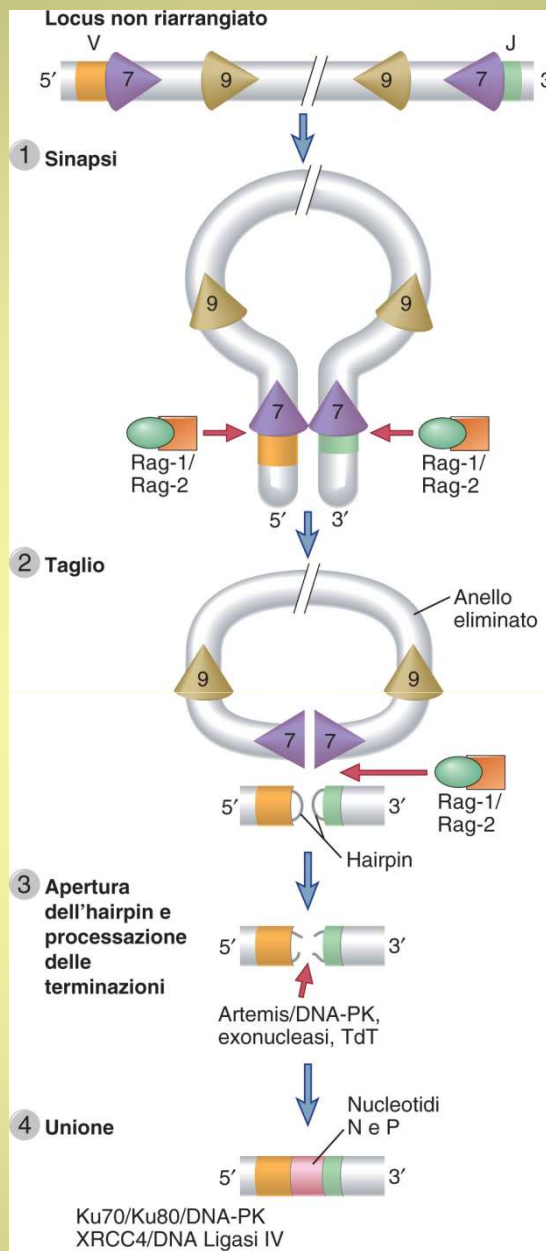
RSS= eptameri e nonameri palindromici conservati Sequenze spaziatrici= 12 o 23 paia di basi

Sequenze spaziatrici a 12 paia di basi= un giro dell'elica del DNA

Sequenze spaziatrici a 23 paia di basi= due giri dell'elica del DNA

Localizzazione delle RSS nel DNA germinale





g12.89
Interruzione cellulare e molecolare 7.01
Suppressione di eventi nella ricombinazione V(D)J. La sinapsi e il taglio del DNA tra segmenti V e J sono mediati da Rag-1 e Rag-2. La terminazione codificante della sinapsi viene aperta dall'endonucleasi Artemis e le estremità tagliate sono ricomparse dal sistema NHEJ.

© 2011 - Copyright Elsevier srl - Tutti i diritti riservati

Meccanismi all'origine della diversità del TCR $\alpha\beta$

- Presenza di molti **segmenti genici V, D, J** nel DNA germinale;
- Ricombinazione tra V-J (catena α) e V-D-J (catena β);
- Flessibilità giunzionale e aggiunta di nucleotidi P e N;
- Associazione tra la catena α e quella β .

Confronto tra le caratteristiche del TCR e delle Ig

	T cell receptor (TCR) 	Immunoglobulin (Ig) 
Components	a and b chains	Heavy and light chains
Number of Ig domains	One V domain and one C domain in each chain	Heavy chain; one V domain, three or four C domains Light chain; one V domain and one C domain
Number of CDRs	Three in each chain for antigen binding; fourth hypervariable region in b chain (of unknown function)	Three in each chain
Associated signaling molecules	CD3 and z	Iga and Igb
Affinity for antigen (K_d)	$10^{-5} - 10^{-7}$ M	$10^{-7} - 10^{-11}$ M (secreted Ig)
Changes after cellular activation		
Production of secreted form	No	Yes
Isotype switching	No	Yes
Somatic mutations	No	Yes
Abbreviations: C, constant; CDR, complementarity-determining region; K_d , dissociation constant; V, variable.		

Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Selezione timica:

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺**

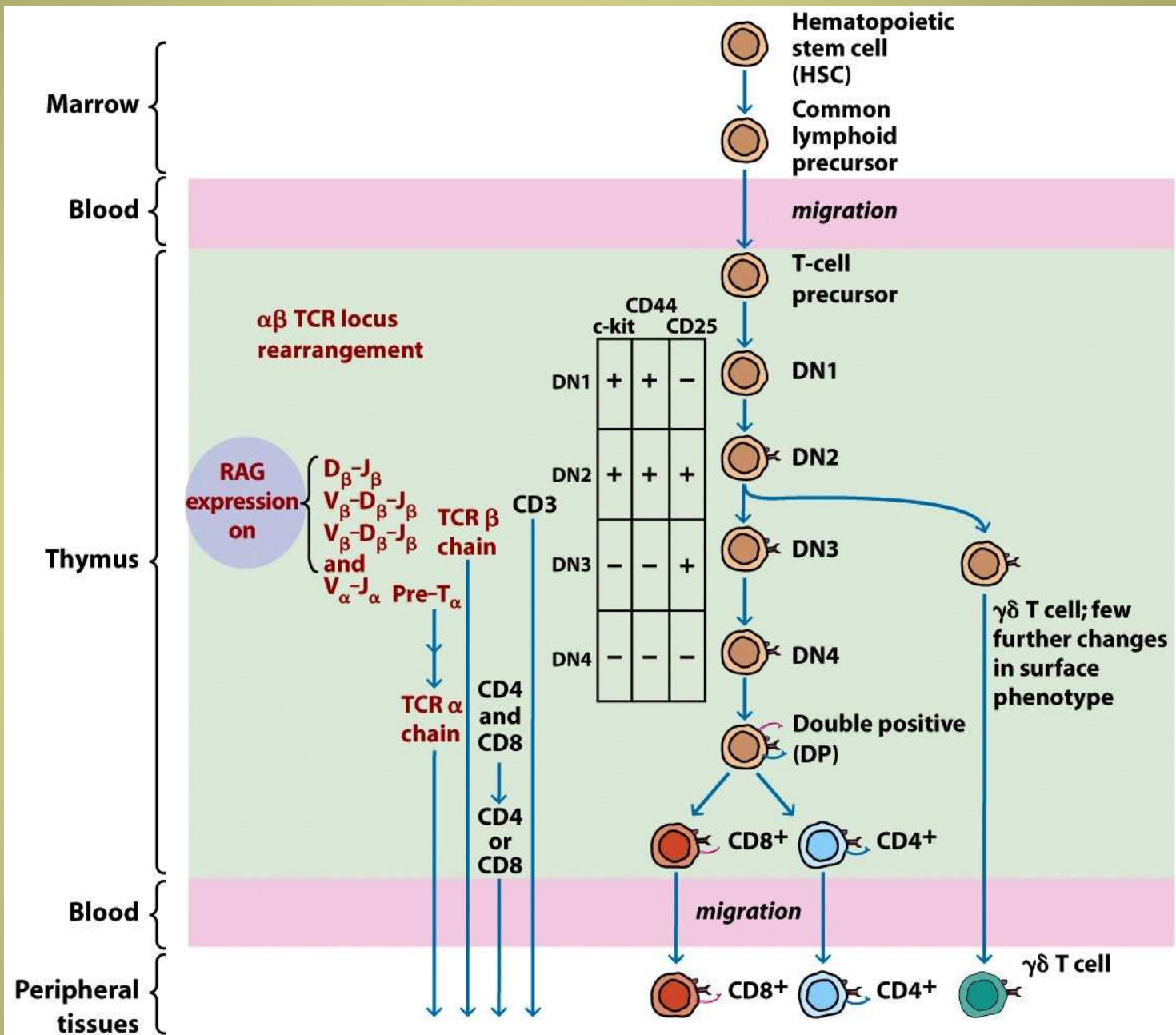


Figure 10-2
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Selezione timica del repertorio dei linfociti T

Allo stadio di cellule **doppio positive** i timociti sono sottoposti a due processi di selezione, definite, **selezione positiva** e **selezione negativa**, che avvengono sulla base dell'affinità del TCR per le molecole MHC-Ag self.

Durante la **SELEZIONE POSITIVA** i timociti “doppio-positivi”, il cui TCR riconosce con bassa/media affinità il complesso “MHC-Ag self”, espresso dalle cellule epitelio-reticolari, sopravvivono. Le altre cellule, **in assenza di segnali di sopravvivenza, vanno incontro a morte per “deprivazione”**

Quindi la **SELEZIONE POSITIVA** conferisce alla cellula T la “**RESTRIZIONE DA MHC**”, cioè la capacità di riconoscere l'antigene associato alle molecole MHC self.

I timociti sopravvissuti alla selezione positiva vanno incontro alla **SELEZIONE NEGATIVA**, durante la quale i timociti con TCR ad elevata affinità per il complesso “MHC-Ag self”, espresso *dai macrofagi e dalle cellule dendritiche*, sono eliminati per apoptosi.

La **SELEZIONE NEGATIVA** assicura la **TOLLERANZA AGLI ANTIGENI SELF** associati alle molecole MHC self.

Durante questi due processi le cellule T acquisiscono il **fenotipo** e la **maturità funzionale**, cioè si formano **cellule T mature singolo-positive** con capacità funzionali helper o citotossiche.

SELEZIONE POSITIVA E NEGATIVA

CORTECCIA

SELEZIONE POSITIVA dei timociti il cui TCR riconosce il complesso MHC-Ag self

DP
Cellule epitelio-reticolari

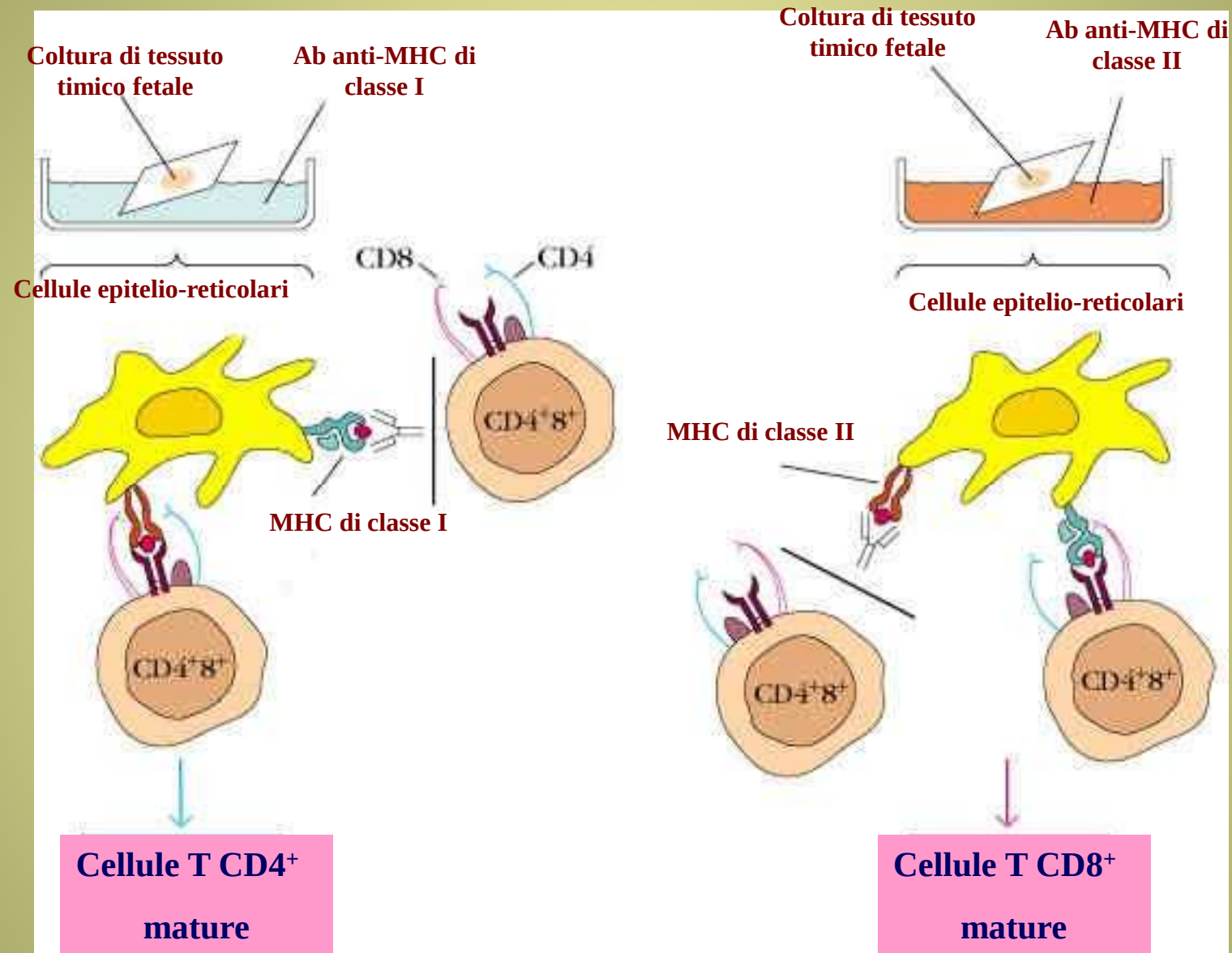
MEDULLA

SP

Cellule CD4⁺ o CD8⁺



Dimostrazione in “vitro” dei processi di selezione



Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

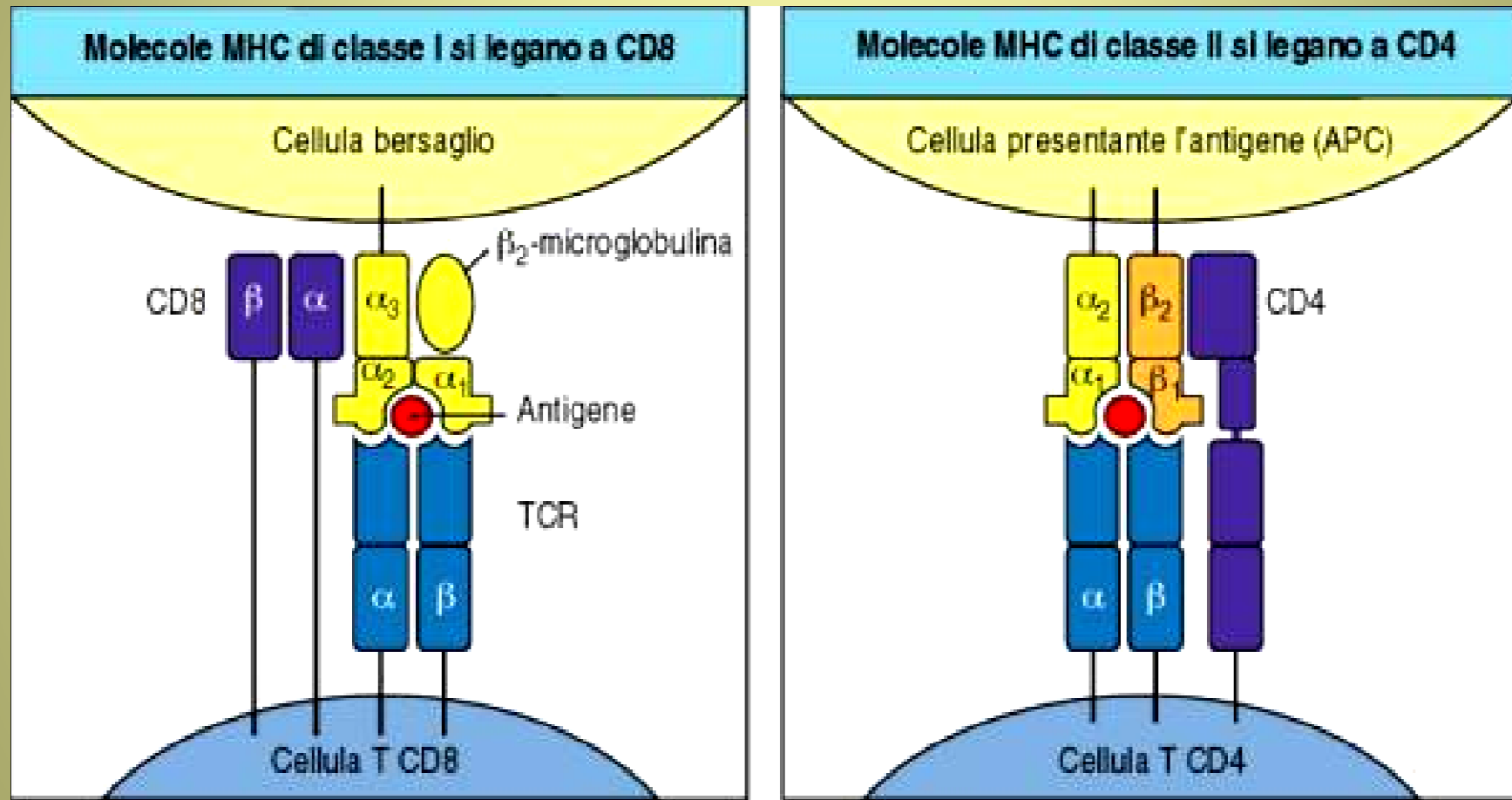
Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺**

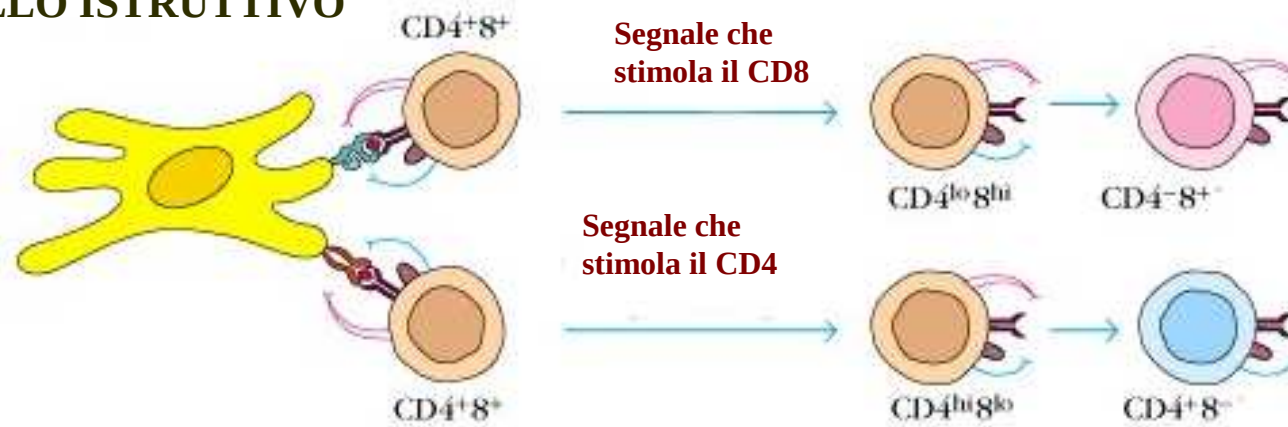
Alla fine della maturazione si ottengono due tipi di cellule T mature, ristrette per l'MHC e tolleranti al self



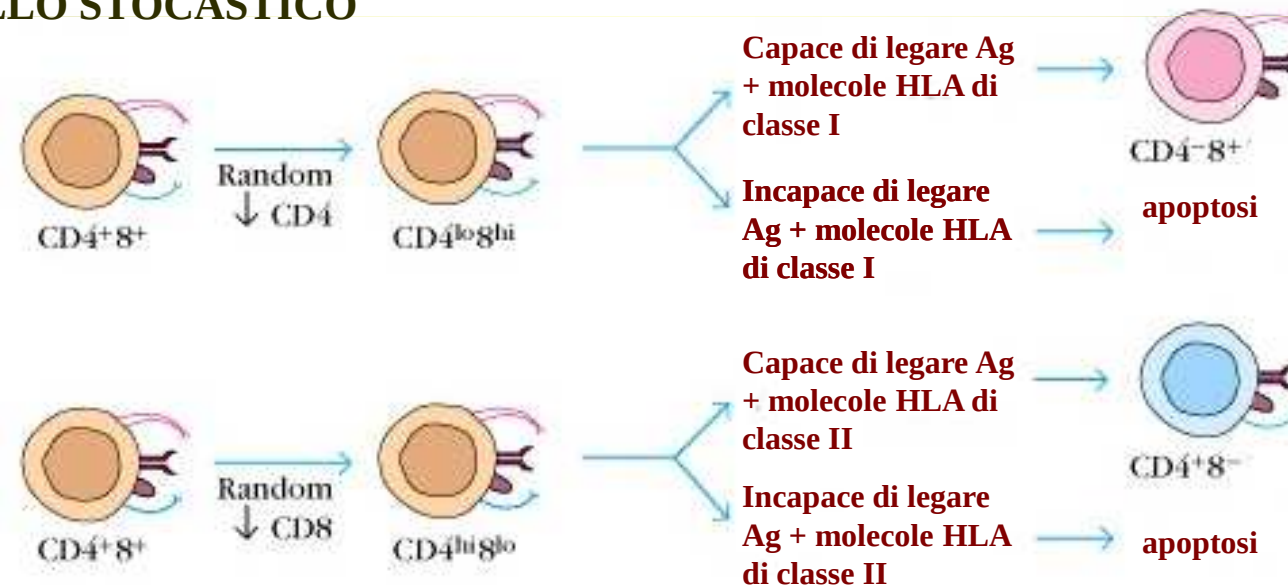
Cellula T citotossica

Cellula T helper

MODELLO ISTRUTTIVO



MODELLO STOCASTICO



Sommario

I linfociti T maturano nel timo

Durante la maturazione i linfociti acquisiscono il TCR, CD3, ζ , CD4 e il CD8

Durante la maturazione i linfociti T passano attraverso diversi stadi di maturazione:

- **Doppio negativi**
- **Doppio positivi**
- **Singolo positivi (CD4 e CD8)**

Durante il passaggio da doppi positivi a singolo positivi acquisiscono la restrizione da MHC (selezione positiva) e la tolleranza al self (selezione negativa)