



## Gli argomenti per i FC

## Immunologia & Immunopatologia

**Materiale di studio:** Libro di Abbas Ed<sup>10</sup>, slides di prof. Albonici, appunti di I.C e di Xh.Gj e il materiale della prova scritta di 38 domande

Benvenuto nel campo di battaglia di questa materia che ci ha portato tutti fuoricorso...

Ironicamente, **non contro un nemico esterno**, ma contro qualcosa che dovrebbe difenderci: **il sistema immunitario**.

Qui non si studiano solo cellule e citochine — si studia **una burocrazia cellulare e molecolare** degna della miglior amministrazione di Tirana: tutto è regolato, supervisionato, e guai a chi sbaglia bersaglio.

La linea di difesa si divide in due reparti:

- **l'immunità innata**, sempre sveglia, impulsiva, pronta a scatenare l'inferno anche per un graffio;
- **l'immunità adattativa**, più colta, più lenta, ma capace di imparare, ricordare e... a volte attaccare per sbaglio i nostri stessi tessuti (ops).

Studieremo cellule che si attivano, si selezionano, si clonano, si suicidano per il bene comune (ciao, apoptosi).

Capiremo perché certi anticorpi sono migliori di altri, perché alcune risposte sono "helper" e altre "killer", e come tutto ciò si coordina (o impazzisce) in malattie autoimmuni, allergie, immunodeficienze.

Per qualche mese, il nostro nemico non sono i patogeni, ma **la complessità**.

E noi ci difenderemo con appunti, schemi, il libro di Abbas e anche qualche mugugno mentre beviamo una tisana immunostimolante.

P.S: Chat GPT è molto bravo in questi tipi di intro.

**Premessa:** I titoli in **blu** indicano argomenti che non fanno parte del documento degli argomenti per i FC ma sono strettamente correlati ad essi, e che sono capitati negli scritti precedenti. Tutti gli altri argomenti che ho trovato li ho raccolti nel 2° tab. Per qualunque cosa potete lasciare un commento. Buono studio!

## Differenze tra immunità innata ed adattativa

	Innata	Adattativa
<b>Caratterisitiche</b>		
<b>Specificità</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Per <b>molecole condivise</b> da microbi di un stesso tipo e molecole prodotte da <b>cellule danneggiate</b> dell'ospite</li> <li>2. Atg-<b>indipendente</b></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Per <b>specifici antigeni</b> microbici e non microbici</li> <li>2. Atg-<b>dipendente</b></li> </ol>
<b>Diversificazione</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Bassa</b>; recettori codificati da singoli gene di <b>linea germinativa</b></li> <li>2. Meccanismi <b>preesistenti</b> all'incontro con il patogeno (presente già alla nascita)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Molto <b>alta</b>; i numerosi recettori per l'antigene originano da geni che vanno incontro a <b>ricombinazione somatica</b></li> <li>2. Acquisita, si sviluppa solo <b>dopo l'incontro</b> con il patogeno</li> </ol>
<b>Memoria</b>	Limitata	Sì
<b>Mancanza di reattività al self</b>	Sì	Sì
<b>Componenti</b>		
<b>Barriere cellulari e chimiche</b>	Cute, epiteli, sostanze antimicrobiche	Linfociti intraepiteliali, anticorpi secreti a livello delle superfici epiteliali
<b>Proteine ematiche</b>	Complemento, lectine	Anticorpi
<b>Cellule</b>	Fagociti (macrofagi, neutrofili), cellule dendritiche, cellule NK, mastociti, ILC	Linfociti T e B

Tabella 1.2 Pg.3 Abbas 10<sup>a</sup>Ed. & Slides #1-OVERVIEW Pg.7

## Cellule dendritiche

- Cellule fagocitarie dell'immunità innata i quali servono anche come cellule presentanti l'antigene (**APC**).
- Le uniche APC in grado di innescare la risposta immunitaria adattativa perché sono le uniche che **presentano nuovi Atg** mai incontrati prima ai **linfociti T naive**.
- Partecipano nelle prime fasi di **immunità innata**; grazie all'espressione di numerosi PRR (recettori) riconoscono diversi PAMP e DAMP.
- Derivano da un precursore mieloide comune con i monociti; differenziano in base di **Flt3 ligand**; esprimono anche la proteina **CD11c**

I tipi:

1. **DC classiche (CDC)** dalla periferia migrano verso i linfonodi per presentare **Atg** proteici ai linfociti **T-naive**:
  - a. **CDC-2** - presentano antigeni a T **CD4+**; più numerose
  - b. **CDC-1** - presentano antigeni a T **CD8+**, a volte anche a T CD4+
2. **DC plasmacitoidi (PDC)**- specializzate contro le **infezioni virali**; riconoscono a.nucleici virali in citoplasma e producono **IFN-1** (proteina antivirale)
3. **DC follicolari (FDC)**
  - Nei follicoli linfoidi (milza, linfonodi, MALT)
  - Non derivano da precursori midollari e non presentano Atg ai linfociti T
  - Captano **Atg legati agli Ab** o a porzioni del complemento, li espongono alla loro superficie e li presentano ai **linfociti B attivati** nei centri germinativi.
4. **Le DC derivate dai monociti (MoDC)**

Derivano da monociti reclutati nel sito infiammatorio; esprimano **CD11c** come tutti i DC
5. **Cellule di Langherans**
  - Le DC dell'epidermide derivanti da precursori midollari del feto e del sacco vitellino
  - Possono contribuire nella presentazione di antigeni ai T CD4+ in caso di infezioni o induzione della tolleranza verso gli antigeni self.

(Slides #2 pg.14-15; appunti I.C pg.12-13 e 50; Abbas 10<sup>a</sup>Ed. Pg. 80 e 132)

## Cellule NK

- Sono ILC (cellule linfoide innate)
- 5-15% delle cellule mononucleate, presenti nel **sangue** come grandi linfociti e **milza**; abbondanti nel **fegato** e **utero gravido**.
- Originano da un precursore comune midollare, dipendono dal **IL-7**

- Cellule **citotossiche**; uccidono le cellule **infettate** da **virus e batteri intracellulari**, come i CTL. A differenza di linfociti T e B non richiedono espansione clonale ed ulteriore differenziazione (quindi naturali) e non esprimono il **corecettore CD3**
- Riconoscono e uccidono cellule **alterati, tumorali**, infettate e **non-self** (trapianti) tramite recettori della linea germinativa.
- Le loro funzioni dipendono dall'equilibrio dei segnali generati da recettori attivatori e inibitori.

I **recettori attivatori** presentano motivi citoplasmatici **ITAM**, con residui di tirosina fosforilati da chinasi - trasduzione del segnale - citotossicità

- **KIR - Killer Cell Ig like Receptor**
- Recettori della famiglia di **lectine** tipo C, es.: **NKG2D** lega MIC-1 e MIC-2, proteine espresse da cellule infettate da virus e cell.tumorali. **NKG2D + subunità DAP 10** trasducono il segnale attivatorio della citotossicità.
- **Recettore attivatorio a bassa affinità CD16**; lega la parte costante Fc degli anticorpi IgG. CD16 genera segnali che attivano le NK a uccidere le cellule rivestite da anticorpi. Questo processo si chiama **ADCC** o citotossicità cellulare anticorpo mediata, una funzione effettrice dell'immunità adattativa.

I **recettori inibitori** presentano motivi citoplasmatici **ITIM**, con residui di tirosina fosforilati da chinasi - reclutamento dei **fosfatasi** i quali rimuovono le chinasi dai recettori attivatori.

I recettori inibitori dei NK **riconoscono MHC-I**, presenti nelle tutte le cellule sane. In questo modo **uccidono le cellule infettate sfuggite all'attacco dei CTL**, per riduzione espressione di MHC-I.

- **KIR che legano le MHC-I**
- Recettori **lectinici** NKG2D+CD94 che lega MHC-I
- **LIR - Leukocyte Ig like Receptor** che lega MHC-I
- Esprimono l'antigene **CD56** responsabile dell'interazione NK- cell.bersaglio
- Esprimono **CD16**

Le due sottopopolazioni in base dell'intensità d'espressione di CD56 e CD16:

- **CD56 ↑ e CD16 ↓ - azione citotossica (90%)**
  - a. IL-12 e IL-15 inducono l'attivazione e l'espansione
  - b. Uccisione tramite granuli citoplasmatici contenenti perforina e granzimi
- **CD56 ↓ e CD16 ↑ - azione secernente** citochine IFN-γ, IL-13, GM-CSF
  - a. Attivano l'infiammazione (IFN-γ attiva la funzione microbica dei macrofagi)
  - b. Modulano la risposta adattativa
  - c. Inducono la maturazione dei DC

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #2 pg.23-30)

## Funzioni delle citochine

**Def.:** Ampia classe di proteine secrete con struttura e funzioni diverse, deputate alla regolazione e al coordinamento di numerose attività delle cellule di immunità.

Secrezione di breve durata.

### Funzioni

- Promuovere la crescita e la differenziazione delle cellule del sistema immunitario
- **Attivare** le funzioni **effettrici** dei **linfociti** e dei **fagociti** che eliminano i microbi
- **Guidare** il movimento delle cellule dal circolo ematico ai tessuti e all'interno dei tessuti. Le citochine chemiotattiche chiamati chemochine fanno possibile l'adesione e migrazione delle cellule.

4 **caratteristiche** per una risposta veloce ed efficace:

- **Pleiotropismo:** svolgono funzioni diversi in cellule diverse  
*Es.:* IL-4: produzione di IgE sui B e differenziazione in TH2 sui linfociti T
- **Ridondanza:** più citochine svolgono le stesse funzioni nella stessa cellula  
*Es.:* IL-2 e IL-4 fanno la proliferazione di cellule B
- **Sinergismo:** L'effetto combinato è maggiore dell'effetto di citochine singole  
*Es.:* IFN- $\gamma$  e TNF aumentano l'espressione di MHC-I
- **Antagonismo:** citochine che inibiscono le attività di altre citochine  
*Es.:* IFN- $\gamma$  attiva i macrofagi e IL-10 gli inibisce

(L'argomento è preparato maggiormente dal libro pg.9 e pg.577 e appunti di I.C)

## Funzioni delle chemochine

Grande famiglia di citochine strutturalmente omologate.

Classificati in base al numero e alla posizione delle prime due coppie di cisteine.

CC: CCL1-CCL28, CXC: CXCL1-CXCL17. Più rari: CX3C e C (una sola cisteina)

### Funzioni

1. Regolano l'extravasazione e il **reclutamento tissutale** dei leucociti circolanti lungo il gradiente di concentrazione delle proteine secrete al sito infiammatorio (chemiotassi).
  - a. Aumenta l'adesione dei leucociti all'endotelio. L'attivazione dei recettori per le chemochine aumenta l'affinità delle integrine (adesione salda).
  - b. Migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio verso il sito di infezione o di danno tissutale.
2. Sviluppo degli organi linfoidei mediante la loro capacità di indirizzare la localizzazione dei leucociti e di altre cellule in aree diverse degli organi linfoidei 2°
3. Migrazione dei DC dai focolai di infezione ai linfonodi. DC attivate catturano e processano l'antigene, esprimono CCR7 che lega il CCL19 e CCL21 nei FRC linfonodali.

(L'argomento è preparato maggiormente dal libro pg.47-49)

## Homing e ricircolo linfocitario

### Ricircolazione linfocitaria

Quando i linfociti T naive fuoriesce dal timo ed entra nel circolo ematico viene indirizzato nei linfonodi, MALT o milza dove si localizza nelle aree T. In caso di mancato riconoscimento dell'antigene il linfocita lascia questi tessuti attraverso il circolo linfatico per ritornare al circolo ematico.

Una volta ritornata nel sangue il linfocita ripete questo ciclo di homing ai tessuti linfoidi. Questo processo si chiama ricircolazione linfocitaria.

Rende la massima possibilità di linfociti specializzati di incontrare l'antigene.

### Homing linfocitario

Il processo che permette la localizzazione selettiva di certe popolazioni linfocitarie a livello dei linfonodi o tessuti specifici (cute, intestino).

#### L'homing dei T nei linfonodi

1. I linfociti circolanti entrano nel linfonodo tramite le HEV localizzate nelle aree T della regione paracorticale. Le HEV mancano nella milza.
2. Il legame della **L-selectina** con **GlyCAM-1** e **CD34** = rotolamento del linfocita sull'endotelio.
3. L'integrina **LFA-1** (Leucocyte Function-associated Antigen-1) viene attivata dalle chemochine CCL19/CCL21 legate nella matrice extracellulare del recettore linfocitario CCR7.
4. LFA-1 attivato si lega al ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1).
5. Il linfocita T migra nel linfonodo per diapedesi. (Super schema nelle slides #2 pg.48 )

La ricircolazione negli **altri tessuti linfoidi** avviene nello stesso modo, a parte che la L-selectina lega MadCAM-1.

La maggior parte di molecole di adesione sono Ca<sup>2+</sup> indipendenti = superfamiglia di Ig, integrine e Ca<sup>2+</sup> dipendenti: selectine e caderine.

#### La fuoriuscita dei linfociti T dai linfonodi e migrazione nei siti d'infiammazione

1. La fuoriuscita è guidata da un chemoattrattante lipidico **S1P** (Sphingosine 1-Phosphate) che lega il recettore **S1PR1** accoppiato a proteine G sui T.
2. Se il linfocita T non riconosce alcun antigene dopo alcune ore, il S1PR1 riprende ad essere espresso ad alti lvi e torna in circolo in modo da avere la possibilità di cercare l'antigene in altri linfonodi.
3. Se il linfocita T riconosce un antigene, il S1PR1 viene inibito per alcuni giorni ad opera dell'antigene e dell'IFN di tipo 1 che provoca l'espressione di CD69 legandosi al S1PR1 intracellulare.

4. Il linfocita T può andare verso differenziazione ed espansione clonale, processo che può richiedere diversi giorni.
5. I linfociti effettori smettono di esprimere CD69, CCR7 e L-selectina in modo di uscire dal linfonodo attraverso il vasi linfatici efferenti nel seno midollare, dotto toracico, vena cava sup. - cuore - sangue arterioso.
6. I linfociti iniziano ad esprimere recettori per chemochine nei siti di infezione e ligandi per E- e P-selectina al lvi di venule postcapillari.

Il homing e la ricircolazione dei linfociti B naive è simile a quello dei T a parte che riconoscono chemochine diverse:

1. Movimento verso i linfonodi: CXCR4 - CXCL12, CCR7—CCL19/21
2. Movimento verso i follicoli: CXCR5 - CXCL13 dei FDC
3. Movimento verso le placche di Peyer: CXCR5, MadCAM-1 - integrina  $\alpha 4\beta 7$

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #2 pg.45-51, appunti di I.C e di Xh.Gj)

## Struttura degli Anticorpi

Proteine prodotte dai linfociti B in seguito all'esposizione ad agenti estranei e servono come BCR o vengono secreti.

- Struttura simmetrica composta da due **catene leggere (L)** e due **catene pesanti (H)** identiche. (Per non confonderti guarda delle foto; Es.: Slides #4 pg.5 o fai un disegno da memoria)
- Le catene H e le catene L:
  - Contengono **unità omologhe ripetute** a formare una struttura globulare definita dominio Ig
  - Presentano **regioni variabili (V)** N-terminali - **riconoscimento** dell'antigene e **regioni costanti (C)** C-terminali - **funzioni effettrici** degli anticorpi.
  - Sono legati tra loro covalentemente da ponti disolfuro tra residui cisteina
- Nelle catene H: la regione V= un dominio Ig e la regione C= 3-4 domini Ig
- Nelle catene L: la regione V= un dominio Ig e la regione C= 1 dominio Ig
- La regione V di una catena H e la regione V di una catena L = sito del legame per l'Atg.
- **Le regioni ipervariabili**
  - 3 brevi segmenti della VL e 3 della VH chiamati **CDR** (regioni che determinano la complementarità)
  - Sono anse che fuoriescono dalla superficie dei 2 domini V e associano per creare una struttura 3D, il qual'è il sito di legame per l'antigene.
  - Le regioni CDR3s sono quelli che presentano il maggiore grado di variabilità.
- Esistono due forme di catene pesanti a livello dell'estremità C-terminale:



- 1 ancora gli anticorpi alla membrana plasmatica dei linfociti B
- 1 guida la secrezione degli anticorpi
- Esistono 5 isotipi di catene H (IgA, IgG, IgM, IgE e IgD) e 2 di catene leggere (K e lambda)

#### IgG del coniglio + papaina

- ★ Tra i domini CH1 e CH2 abbiamo la regione cerniera. Da **flessibilità** ed è sensibile a **proteolisi**. L'enzima **papaina** separa l'anticorpo in 3 **frammenti**:
  - a. 2 identici che si chiamano **Fab** (Fragment antigen binding) perche contengono i domini VL e CL
  - b. I domini CH2 e CH3 tendono di aggregarsi tra loro e cristallizzarsi  
Fc = Frammento cristallizzabili

#### IgG del coniglio + pepsina

- ★ Lo taglia distalmente rispetto alla regione cerniera, dando origine a un frammento F(ab')<sub>2</sub> con due siti identici di legame all'antigene con la regione cerniera e i ponti disolfuro intatti.

**IgA e IgM** contengono una peptide **catena J** (joining) nella sequenza di coda e formano complessi **multimerici** che stabilizza il complesso, ne facilita il trasporto verso il lume degli epiteli e aumenta le possibilità di legare antigeni; IgA dimerica; IgM pentamerica  
IgG e IgE sono monomerici; IgE non vengono secreti; IgD e IgM, gli unici BCR

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #4.)

## Funzioni effettrici degli anticorpi

Isotopi diversi di Ig svolgono funzioni differenti, in base della porzione costante dell'Ab.

Isotipo	Funzioni effettrici in isotipo specifiche
<b>IgG</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ <b>Opsonizzazione</b>, un processo di rivestimento di Atg: facilita il riconoscimento, l'opsonizzazione e la fagocitosi da parte di neutrofili e macrofagi i quali esprimono i recettori FcγRI o CD64 e FcγRIIA/C o CD32 attivati dal <b>IFN-γ</b></li><li>➤ Attivazione del via <b>classica</b> del complemento (IgG1 e IgG3)</li><li>➤ <b>ADCC</b> (Citotossicità cellulare anticorpo dipendente) da NK che esprime FcγRIIIA o CD16 solo sui IgG aggregate su cellule infette e fanno citotossicità e secernono <b>IFN-γ</b></li><li>➤ Immunità <b>neonatale</b> (trasferimento di Ab attraverso la placenta e l'intestino)</li><li>➤ Feedback <b>inibitorio</b> delle cellule B (mediante il recettore inibitorio FcγRIIB)</li></ul>
<b>IgM</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Attivazione della via <b>classica</b> del complemento</li><li>➤ <b>BCR</b> (Recettore dell'<b>Atg</b> per linfociti <b>B</b> naive) in caso se è integrato alla membrana</li></ul>

<b>IgA</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Immunità delle mucose (respiratoria, gastrointestinale)</li><li>➤ Attivazione della via <b>alternativa</b> o <b>lectinica</b> del complemento</li></ul>
<b>IgE</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Degranulazione dei mastociti (ipersensibilità immediata)</li></ul>
<b>IgD</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ <b>BCR</b>: Recettore per l'<b>Atg</b> dei linfociti <b>T</b> naive (mai secrete)</li></ul>

(L'argomento è preparato totalmente dalle slides #5)

## Sistema HLA (Organizzazione genica)

Gli HLA o **Human leukocyte Antigens** sono semplicemente la **versione umana** delle **molecole MHC** con funzione di legare frammenti peptidici che derivano da microbi. I geni sono trovati nel braccio corto del cromosoma 6, disposti dal tetramero verso il centromero. La **mappa** del MHC-umana:

- La regione per MHC-II umana presenta: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, anche geni per tapasina, TAP-1, TAP-2, proteasoma.
- La regione per MHC-I: HLA-A, HLA-C, HLA-B, HLA-G (tolleranza materno-fetale), MICA
- Esiste anche un regione di classe III: MICB, fattori di complemento C4b, C4a, Fattore B, C2

Caratteristiche:

1. **Poligenico** - vi sono **numerosi geni** che codificano per le proteine di classe I e II con una diversa specificità per i peptidi, per impedire l'elusione della risposta immunitaria i loci che codificano per MHC-I e MHC-II.  
I geni della regione MHC sono molto vicini a loro e vengono ereditati insieme (a meno che non si verifichi una crossing over nella meiosi, <3% di possibilità)  
Ogni combinazione dei geni ereditati da ciascun genitore è detto **aplotipo**.
2. **Polimorfico** - esistono **numerosi alleli** per ogni gene.  
Nell'uomo ciascun allele HLA è identificato con numeri (es HLA-A2, HLA-B5, HLA-DR3...).  
Polimorfismo e poligenia contribuiscono alla **diversità delle molecole MHC** espresse da un individuo, riflettendo una strategia contro l'evasione immunitaria dai patogeni che fanno mutazioni.  
Ogni individuo non può esprimere più di 2 alleli per ogni singolo locus MHC, indipendentemente dal polimorfismo. Perciò la poligenia contribuisce ad **aumentare il numero di molecole diverse** espresse in un individuo.  
Le MHC possono presentare centinaia di varianti alleliche (es.: HLA-B migliaia)
3. **Codominante** - in ogni individuo sono espressi i prodotti di **entrambi gli alleli** (un cromosoma dal padre e uno dalla madre).

Permette ad un individuo di **massimizzare il numero di molecole MHC disponibili** a legare i peptidi per la presentazione di Atg.

## MHC

I **MHC** (Major Histocompatibility Complex) sono molecole con funzione di facilitare la presentazione di un unico frammento molecolare antigenico sulla superficie di cellule in un riarrangiamento unico riconoscibile dalle cellule effettrici: i linfociti T.

1. Ogni MHC è costituito da una **tasca** per i legare peptidi seguita da una copia di **domini Ig** ancorati alla cellula con un dominio transmembrana e uno citoplasmatico.
2. I residui di aa polimorfi peptidici sono localizzati all'interno adiacenti alla tasca di legame per il peptide; gli aa variano tra i differenti alleli MHC.
3. I residui non polimorfici di tipo Ig contengono siti di legame per i corecettori. I T CD8+ sono ristrette per MHC-I e i T CD4+ sono ristrette per MHC-II.

### MHC-I

Esprese costitutivamente su tutti i tipi di cellule **nucleate** e riconosciute dai T CD8+ in risposta a patogeni intracellulari.

#### Struttura

- **Eterodimero:** 1 catena  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), 1 catena  $\beta 2\text{-m}$  (microglobulina) non codificata da geni MHC e un peptide antigenico. Il legame dell'antigene stabilizza il legame tra  $\beta 2\text{-m}$  e la catena  $\alpha$  e dall'altra parte l'interazione  $\alpha$  e  $\beta 2\text{-m}$  rafforza il legame del peptide. Solo le MHC-I che hanno legato il peptide saranno esposte sulla superficie cellulare.
- $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  formano una piattaforma di foglietto  $\beta$  che sostengono 2 nastri paralleli ad  $\alpha$  elica. Questa insieme costituisce la tasca del legame per peptidi di **8-12 aa**. Le estremità della tasca sono chiuse per non alloggiare peptidi più grandi.
- In  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  troviamo i residui polimorfi responsabili del legame e del riconoscimento dei peptidi.
- $\alpha 3$  lega il CD8, il recettore del TCR.

### MHC-II

Esprese solo sui APC, DC, linfociti B, macrofagi, cellule epiteliali timiche riconosciute dai T CD4+, i quali attivano la risposta microbica dei **macrofagi** e attivare i **linfociti B** a produrre anticorpi (**Ab**) in risposta a patogeni extracellulari.

#### Struttura

- **Eterodimero:** 1 catena  $\alpha$ , 1 catena  $\beta$  e un peptide antigenico legato.  
L'espressione stabile del MHC-II richiede la presenza di tutte e 3 le componenti.

- $\alpha$ -1 e  $\beta$ -1 formano la tasca del legame per i peptidi. Le estremità N-terminali della tasca sono aperte così da permettere l'alloggiamento di peptidi a **10-30 aa**.  $\beta$ 1 contiene residui polimorfi maggiori di  $\alpha$ 1.
- I segmenti  $\alpha$ 2 e  $\beta$ 2 hanno sequenze costanti che non variano tra i diversi alleli. Un'ansa del segmento  $\beta$ 2 di MHC-II è sito di CD4.

## Processazione dell'antigene e presentazione con MHC-I

Proteine di derivazione citosolica - MHC-I - Tutte le cellule - T CD8+

Struttura MHC-I: 1 catena  $\alpha$  ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3);  $\alpha$ 3 - lega il corecettore CD8 e 1 catena  $\beta$ 2 microglobulina non codificata da geni MHC.

1. Generazione di **Atg proteici nel citosol**, provenienti da virus, batteri intracellulari, da cross-presentazione (Atg da altre cellule), geni mutati etc, da parte di **proteasoma**, un complesso multiproteico proteolitico di 2 anelli  $\beta$  intrinseci e 2  $\alpha$  esterni. Ogni anello ha 7 subunità.
2. La **proteolisi** avviene da parte delle **subunità  $\beta$ 1/2/5**; taglia le proteine ubiquitinate in piccoli peptidi di 8-12 aa.
3. **Trasporto dei peptidi nel RE dal TAP** (trasportatore associata alla presentazione); fa un trasporto attivo ATP-dipendente dei peptidi nel RE, guidata dalla **tapasina** (ha affinità per i MHC-I) verso i siti pieni di MHC-I. Tapasina fa parte di un complesso con **ERp57** (taglia e crea ponti disolfuro) e **chaperonine**.
4. **Assemblaggio** dei complessi peptide-MHC-I ed **espressione** sulla membrana:
  - a. Nel RE vengono sintetizzate le catene  $\alpha$  del MHC-I e  $\beta$ 2 microglobulina i quali si legano peptide. La conformazione appropriata di  $\alpha$  è aiutata da **chaperonine** (calreticulina/calnexina).
  - b. Una volta legati, il trimero perde l'affinità per la tapasina, viaggia dal RE a Golgi e tramite le vescicole esotiche si **trasloca** nella membrana cellulare, il quale viene riconosciuta da T CD8+.

## Processazione dell'antigene e presentazione con MHC-II

Proteine di origine extracellulare endocitate - MHC-II - APC - T CD4+

Struttura MHC-II: 2 catene  $\alpha$  e  $\beta$  codificata da geni MHC. La subunità  $\alpha$ 2 lega il CD4.

1. Generazione di **Atg proteici** negli compartimenti vescicolari (**endosomi**)  
Gli Atg extracellulari catturati e internalizzati dalle APC oppure sono ex-proteine citoplasmatiche intrappolate negli autofagosomi.
2. Negli **endolisosomi** si crea ambiente acido e pieno di enzimi proteolitici le **cathepsine** (tiol ed aspartil proteasi) che fanno la **proteolisi** delle proteine in peptidi di **10-30 aminoacidi**.
3. Le MHC-II sono prodotte nel RE e sono legate ad una **proteina invariante** che impedisce al MHC-II di legare peptidi nel RE. La conformazione delle catene è aiutata da chaperonine (calnexina).

Il complesso MHC-II e proteina invariante lascia il RE in vescicole che si fondono con gli **endolisosomi**.

4. **Assemblaggio** dei complessi peptide-MHC-II ed **espressione** sulla membrana:
  - a. Negli endosomi gli enzimi e HLA-DM rimuove gran parte della proteina invariante lasciando solo 24 a.a, il **CLIP** e i peptidi possono legarsi alle tasche ora disponibili.
  - b. Il CLIP va rimosso e scambiato da antigeni dotati di maggiore affinità ad opera di **HLA-DM** (scambiatore dei peptidi). HLA-DO può inibire HLA-DM.
  - c. I peptidi endosomiali legano le MHC-II. L'endosoma si fonde con la membrana plasmatica, dove si integra anche il trimero MHC-II- peptide e viene riconosciuto da T CD4+.
  - d. Le molecole di MHC-II sono degradate e riciclate da un ubiquitina E3 ligasi, chiamata MARCH-1.

(Entrambi gli argomenti sono maggiormente preparati dagli appunti di XH.Gj e I.C)

## Recettore per l'antigene dei linfociti T [TCR]

Il recettore dell'antigene TCR dei T CD4+ e T CD8+ ristretti per MHC è un eterodimero composto da due catene polipeptidiche transmembrane  $\alpha$  e  $\beta$  unite covalentemente da ponti disolfuro. Il TCR, gli eterodimeri **CD3  $\gamma\epsilon$**  e **CD3  $\delta\epsilon$**  e l'omodimero  **$\zeta\zeta$**  costituiscono il complesso del TCR con **funzioni**:

- Riconoscimento specifico dell'Atg (associato a MHC)
- Adesione stabile alle APC
- Trasduzione dei segnali di attivazione

TCR è un recettore clonamente distribuito; i cloni di linfociti di specificità diversa esprimono TCR diversi.

### Struttura

- **TCR  $\alpha\beta$** ; eterodimero legato da ponti disolfuro
  - Ogni catena  $\alpha$  e  $\beta$  = un dominio Ig **variabile** (V) N-terminale e un dominio Ig **costante** (C) C-terminale, una regione idrofobica transmembrana, una regione citoplasmatica, troppo corte a trasdurre il segnale. La porzione extracellulare è simile al Fab degli anticorpi.
  - Le regioni V contengono brevi sequenze ipervariabili **CDR**, 3 di  $\alpha$  e 3 di  $\beta$ , i quali riconoscono in modo specifico i MHC-II-peptide.
- **2 CD3**: espressione dei TCR in M.P e la trasduzione del segnale
  - Ciascuna CD3 è costituito da due catene (1  $\gamma\epsilon$  ed una  $\delta\epsilon$ ) e ciascun catena:
    - ➔ nella regione extracellulare possiede un singolo dominio Ig
    - ➔ in citoplasma possiede un dominio di 44 a 81 aa che contiene un dominio ITAM. Due CD3 = 4 ITAM
- **2 Catene  $\zeta$**  (Zeta): trasduzione del segnale

- $\zeta$  ha una breve regione extracellulare di 9 aa, una regione transmembrana e una regione citoplasmatica di 113 aa con 3 domini ITAM.
- $2\zeta = 6$  ITAM e in totale = 10 ITAM per la trasduzione del segnale

I segmenti transmembrana di **CD3** e di  $\zeta$  hanno un residuo di **a.aspartico** caricati (-) i quali si legano ai residui di lisina ed arginina (+) mantenendo il complesso associato.

### Trasduzione del segnale

1. Quando TCR lega il complesso MHC-peptide, i corecettori si aggregano al TCR.
2. Il complesso TCR cambia conformazione e rende disponibili i motivi ITAM delle CD3 e catene  $\zeta$  per la fosforilazione da parte di chinasi.
3. I corecettori **CD4** e **CD8** amplificano la trasduzione del segnale:
  - CD4 lega i domini non polimorfici  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  dei MHC-II.
  - CD8 lega il dominio non polimorfico  $\alpha 3$  di MHC-I.
4. La **chinasi LCK** è legato a CD4 e CD8 e fosforila i ITAM della catena  $\zeta$  e di CD3. CD3 presenta anche le **chinasi Fyn**.
5. Le sequenze ITAM  $\zeta$  fosforilate ancorano la **protein chinasi ZAP70**.
6. ZAP70 fosforila proteine adattatrici, **LAT**, **PLC $\gamma$ 1** con reclutamento di altre proteine come GRB2.
7. La regione di contatto tra il linfocita T e APC si chiama sinapsi immunologica (SMAC); permette un rilascio direzionato del contenuto dei granuli secretori.
8. A valle di TCR vengono attivati 2 principali membri di **proteine G**, RAS e RAC.
9. RAS-GDP si attiva in RAS-GTP da parte di LAT, GRB2 e SOS.
10. **RAS-GTP** inizia la cascata di **MAP-chinasi** (ERK, JNK), la quale può attivare il fattore di trascrizione **AP-1** (funziona meglio in combinazione con NFAT)

Diverse vie di attivazione attivano diversi fattori di trascrizione.

1. La **fosfolipasi Cy o PLC $\gamma$ 1** idrolizza il fosfatidilinositolo o **PIP2** nel foglietto interno della plasmalemma e genera PIP3 + DAG (diacilglicerolo).
  - **DAG**, attiva le proteine chinasi C  $\square$  (PCK) che porta all'attivazione del fattore di trascrizione, es.: **NFAT** (fa l'espressione dei geni che codificano per IL-2, IL-4 e TNF e altre citochine.)
  - **IP3** aumenta la permeabilità di calcio, lega la **calmodulina** che attiva la calcineurina, un attivatore del **NF- $\kappa$ B**.
- **TCR  $\gamma\delta$**  come il TCR  $\alpha\beta$  presente domini Ig variabili e costanti, sequenza cerniera e brevi code citoplasmatiche. A differenza dei TCR  $\alpha\beta$  riconoscono Atg di natura lipidica e glicolipidica e heat shock protein su MHC non convenzionali
- **I linfociti T  $\gamma\delta$  (5%)** secernono citochine e fanno citotossicità come. Sono linfociti di prima linea di difesa, più abbondanti in epiteli. Hanno una diversificazione più limitata e riconoscono anche Atg non processati.

(Non ho alcuna possibilità di scriverlo tutto nell'esame. 😊 Cmq l'argomento è fatto principalmente dagli appunti I.C.)

## Ruolo delle molecole accessorie

Molecole espresse sulla superficie dei linfociti T. Insieme al complesso TCR contribuiscono all'**attivazione** ed alla **differenziazione** dei linfociti T. Suddivisi in:

**Corecettori** - amplificano la trasduzione del segnale di TCR legandosi ai MHC

1. **CD4**: monomero di 4 domini Ig extracellulari, una parte transmembrana e una coda citoplasmatica di 38 aa, altamente basica.  
I due domini N-terminali **legano** i domini non polimorfici  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  di MHC-II.
2. **CD8**: dimero di 2 domini Ig extracellulari, una parte transmembrana e una coda citoplasmatica di 25 aa. Lega il dominio non polimorfico  $\alpha 3$  di MHC-I.

Partecipano agli eventi precoci della trasduzione del segnale.

Nelle code citoplasmatiche presentano la **protein chinasi L $\gamma$ k** - fosforila i domini ITAM di **CD3** e delle **catene  $\zeta$** . (CD3 e catene  $\zeta$  fanno parte del complesso TCR).

**Recettori costimolatori ed inibitori** - inviano segnali di stimolazione/inibizione sulle APC ma legano molecole diverse da MHC.

1. **CD28** - omodimero costituito da due catene ciascuna con un singolo dominio Ig extracellulare e lega il **B7** (1 o 2) sulle APC. Trasduce segnali per l'espressione di proteine anti-apoptotiche, fattori di crescita necessari per la differenziazione dei T. Presente nel 90% dei T CD4 + e 50% dei T CD8+  
**CD40L** lega il recettore **CD40** sui linfociti B stimolando l'espressione di B7.  
**IL-12** e altre citochine prodotte da APC contribuiscono all'attivazione dei T.  
**Anergia**: Inattivazione dei linfociti T quando il TCR riconosce l'antigene in mancanza di espressione di molecole costimolatorie dal APC.
2. **CTLA-4**: strutturalmente omologo a CD28, lega il **B7** su APC - inibisce l'att. di T
3. **CD2** - glicoproteina espressa su 95% dei T maturi. Contiene 2 domini Ig extracellulari e una lunga coda citoplasmatica; legano il **LFA-3** (ruolo in adesione e trasduzione)
4. **LFA-1** lega ICAM-1 sulle APC ed endotelio - adesione
5. **VLA-4** lega VCAM-1 sul endotelio - adesione

### Riassunto

CD4 -  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  MHC II

CD8 -  $\alpha 3$  MHC-I

CD28 - B7; CTLA-4- B7

CD2 - LFA-3

LFA-1 - ICAM-1; VLA-4 - VCAM-1

## Recettore per l'antigene dei linfociti B [BCR]

Il recettore per l'antigene dei linfociti B (BCR) è costituito da un anticorpo transmembrana, associato a due catene responsabili della trasduzione del segnale.

**Struttura** - BCR = Ab + Ig $\alpha$  e Ig $\beta$



Gli anticorpi di BCR sono le IgM e IgG di membrana - hanno una coda citoplasmatica corta composta solo da tre aminoacidi, troppo corta per trasdurre il segnale.

La trasduzione avviene da parte delle **Igα** e **Igβ**, i quali presentano ITAM nelle code citoplasmatiche legate con gli anticorpi tramite ponti disolfuro e associate a tirosin chinasi LYN, FYN e BLK.

Le cellule che sono andate incontro a scambio di classe (B memoria) i complessi BCR contengono Ig che sono di classe IgG, IgA o IgE, con coda citoplasmatica più lunga.

### Trasduzione del segnale

1. L'interazione dell'antigene con gli IgM e IgD porta alla loro aggregazione e l'avvicinamento delle proteine chinasi associate a **Igα** e **Igβ**.
2. Le protein chinasi fosforilano le ITAM e forniscono i domini di aggancio SH2 per la protein chinasi SYK la quale attiva una serie di proteine adattatrici.
3. Se la stimolazione dell'antigene è poca può essere necessaria anche l'attivazione dai T helper.
4. La proteina del complemento C3d (forma tagliata di C3b) lega l'antigene o l'immunocomplesso, il quale lega il corecettore **CR2/CD21** del complesso BCR.
5. Il CR2 è espresso sulla membrana con CD19 e CD81.  
CR2 + CD19 + CD81 = TAPA-1 = complesso corecettoriale
6. CD19 viene fosforilato e attiva la chinasi PI3 che genera PIP3.
7. PIP3 attiva la protein chinasi BTK e PLCγ2 o PDK1 e PLCγ1 = potenziamento  
La trasduzione a valle è simile a quella di TCR.
8. BTK attiva la proteina adattatrice SLP-56 la quale attiva il GRB2 - tramite il dominio SOS fa lo scambio GTP/GDP su RAS e RAC attivando la cascata di RAS-MAP chinasi - att. di fattori di trascrizione (MYC, NFAT, AP-1, NF-κB)
9. PLCγ taglia il PIP2 in IP3 e DAG.
  - IP3 - aumento il Ca<sup>2+</sup> citosolico e att. i fattori di trascrizione
  - DAG - attivare il PKC - att. dei fattori di trascrizione

In base ai segnali i linfociti B naive possono differenziarsi in plasmacellule secernenti Ab o in cellule B di memoria.

(L'argomento è preparato maggiormente dal libro, capitolo 8)

## Ricombinazione V(D)J

(Devi studiare la foto 8.8, 8.10, 8.11 e 8.12 pg.202-207 Abbas 10<sup>a</sup>Ed. per capire meglio l'argomento)

I geni che codificano i diversi recettori per l'antigene dei linfociti T e B sono generati dalla **ricombinazione** di diversi segmenti della regione **variabile** (V) con segmenti delle regioni della **diversità** (D) e **unione** (J). Questo processo si chiama ricombinazione V(D)J.

Loci separati codificano per le catene pesanti e per le catene leggere κ e λ delle Ig e per le catene **α**, **β**, **σ**, **γ** dei TCR.

Questi loci contengono segmenti genici V, J e segmenti D **solamente** nei loci della **catena pesante delle Ig** e delle **catene β e σ** del recettore dei linfociti T.



Le proteine responsabili della ricombinazione V(D)J agiscono riconoscendo particolari sequenze di DNA definite sequenze segnale di ricombinazione o **RSS**.

RSS = 7 nucleotidi (**eptamero**) + spaziatore (12bp) + **nonamero** (9 nucleotidi).

### Processo

1. **Sinapsi** - processo attraverso il quale 2 segmenti codificanti distanti, selezionati casualmente, e il loro RSS adiacenti che hanno acquisito specifici **motivi istonici** (necessari per l'accessibilità degli enzimi, per es.: ipermetilazione della lisina sull'istone 3 - H3K4), vengono riuniti da un evento di looping cromosomico e tenuto in posizione per il successivo taglio.
2. **Taglio** - eseguita da **V(D)J ricombinasi**, composta da due molecole proteiche **RAG1** (attività proteolitica) e **RAG2** (lega H3K4), che crea rotture al doppio filamento a livello delle giunzioni delle sequenze codificanti RSS, tra l'eptamero e la sequenza codificante V, D o J adiacente.

**Esempi:** Nella ricombinazione da V a J della catena leggera delle Ig le rotture saranno effettuate a 3' di un segmento V e a 5' di un segmento J. Nelle catene pesanti e TCR **β e σ** avviene su entrambi i lati (sia 5' che 3') dei segmenti D. Il DNA intermedio con le estremità che contengono il RSS viene rimosso sotto forma di un cerchio (delezione) e le estremità codificanti V e J vengono unite.

- ★ In alcuni segmenti gli RSS **specialmente** nel locus Igk, sono 3' di un Vk e 3' di un Jk, vuol dire che non si fronteggiano e non si ha delezione ma inversione e gli RSS fusi sono mantenuti nel cromosoma. (foto 8.8 pg.202)

Due tipi di riarrangiamenti:

- a. Nei loci per la catena **leggera Ig** e per le catene **α e γ** del TCR un singolo evento di riarrangiamento unisce casualmente il segmento del gene V a un segmento J.
- b. Nei loci per la catena **pesante Ig** e per le catene **β e σ** del TCR avvengono due eventi di riarrangiamento sequenziali:
  - il primo ricongiunge un segmento **D** a un segmento **J**
  - il secondo ricongiunge il neoformato segmento **DJ** a un segmento **V**.

### Regola di 12/23

La ricombinazione avviene solo se uno dei segmenti è affiancato da uno spaziatore di 12 nucleotidi e l'altro è affiancato da uno spaziatore di 23 nucleotidi.

**Esempio:** Nel locus della catena pesante delle Ig, gli RSS che fiancheggiano i segmenti V e J hanno spaziatori di 23 nucleotidi e non possono legarsi.

Deve prima avvenire la ricombinazione D-J e poi quella V-DJ.

In **continuo** dopo il taglio da RAG1, il 3' OH rilasciato dall'estremità codificante attacca poi un **fosfodiester** sull'altro filamento di DNA formando una **hairpin** covalente e chiusa tenuta in apposizione alla hairpin chiusa dell'altra estremità.

3. L'**apertura di hairpin e trasformazione delle estremità** da parte di endonucleasi **ARTEMIS**. A questo livello avviene un alto grado di diversificazione dovuta a:
  - a. **Diversità combinatoriale**: il nr massimo possibile di combinazioni di questi segmenti è il prodotto del numero di segmenti genici V(D)J. ( $V_n D_n J_n$ )
  - b. **Diversità giunzionale** dall'aggiunta o rimozione di nucleotidi alle giunzioni. Deossinucleotidil transferasi terminale (**TdT**) aggiunge nucleotidi all'estremità rotte del DNA:
    - **Nucleotidi P**: aggiunti di nucleotidi complementari della catena più lunga.
    - **Nucleotidi N**: aggiunta di nucleotidi non templati/ non da stampo.La causa perché gli anticorpi e i TCR mostrano la massima variabilità in corrispondenza della terza regione ipervariabile CDR3.
4. **Giunzione**; le estremità codificanti rotte sono riunite e legate da un processo di riparazione da parte di enzimi come **DNA-ligasi IV** e protein-chinasi **DNA-PK**.

### Riassunto

V(D)J - segmenti genici di variabilità, diversità e di unione necessari per la ricombinazione dei recettori T e B. I segmenti D sono presenti solo nelle catene pesanti Ig e catene  $\beta$  e  $\sigma$  dei TCR.

I fasi sono:

1. Sinapsi: RSS del DNA vengono uniti a forma di looping.
2. Taglio: Rag1 taglia a livello di RSS. Prima si forma il segmento DJ e poi si aggiunge il V. (Regola di 12/23). All'estremità dei segmenti abbiamo gli hairpin.
3. Apertura di hairpin: ARTEMIS apre i hairpin e TdT aggiunge nucleotidi P e N.
4. Giunzione: dagli enzimi DNA-ligasi IV e DNA-PK.

## Maturazione dei linfociti B

I principali eventi nel corso della maturazione dei linfociti B sono il **riarrangiamento e l'espressione dei geni per le Ig** secondo un ordine preciso:

1. La selezione e la proliferazione dei linfociti B che esprimono il pre-recettore per l'antigene
2. La selezione del repertorio dei linfociti B maturi.

### Processo

1. Le cellule staminali **HSC** sono indirizzate verso la linea B dai fattori trascrizionali EBF, E2A, PAX5.

2. Le cellule staminali vanno verso lo stadio **pro-B**: **Non produce Ig**, esprime **CD19/10/43**. Esprime i geni **Rag 1 e 2** che mediano la prima ricombinazione della catena pesante (**IgH**): prima avviene la J-D e poi V-DJ; si ha anche l'aggiunta di nucleotidi giunzionali N da Tdt. La proliferazione dei B avviene dal **IL-7**.

3. **Pre-B**: si produce la **catena  $\mu$**  e si associa alle **catene leggere surrogate** ed invarianti  **$\lambda 5$**  e **Vpre-B** omologhe alle catene leggere  $\kappa$  e  $\lambda$ . Sulla membrana si esprime il **pre-BCR** (la **catena  $\mu$  +  $\lambda 5$**  e **Vpre-B + Ig $\alpha$  e Ig $\beta$** ). L'espressione del pre-BCR = 1° **checkpoint** nella maturazione dei linfociti B. Il **Btk** (Tirosin-chinasi di Bruton) è necessaria per la sopravvivenza e la maturazione dei linfociti pre-B.

Nel frattempo inizia la ricombinazione V-J delle catene leggere.

- Se al locus della catena  $\kappa$  avviene un riarrangiamento produttivo, il linfocita inizierà a produrre la catena leggera  $\kappa$ .
- Se al locus  $\kappa$  avviene un riarrangiamento autoreattivo, il linfocita inizierà a produrre la catena leggera  $\lambda$ .

Un singolo clone linfocitario B esprime solo uno dei 2 tipi di catene leggere = **esclusione isotipica della catena leggera**.

In questo stadio se la **catena  $\mu$**  è corretta, ci saranno abbastanza segnali di sopravvivenza dal pre-BCR che inibiscono il riarrangiamento del locus IgH sull'altra cromosoma.

⚠ **Attenzione**: Un linfocita B può codificare proteine della catena pesante delle Ig a partire da un solo dei due alleli ereditati = **esclusione allelica**.

Se la ricombinazione non è corretta si usa l'**allele sull'altro cromosoma** per rifare la ricombinazione. Se fallisce anche questo editing = **apoptosi**.

4. **B-immaturo**: **esprime** sulla membrana  **$\mu + \kappa / \lambda = \text{IgM}$**  (ricombinazione completa) + **Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  = BCR maturo**.

Se il BCR è **corretto** favorisce la sopravvivenza e blocca l'espressione dei Rag, bloccando ulteriori riarrangiamenti.

A questo punto avviene la **selezione** in base dell'affinità per gli **Atg self**

I linfociti B molto **autoreattivi** = **apoptosi**.

Se il BCR **non è corretto** → editing recettoriale o apoptosi.

Quando il BCR incontra l'Atg si blocca la proliferazione ed inizia il differenziamento verso B maturo.

5. **Il B maturo** è CD34- e di varie tipologie:

- a. B-1: secerne IgM in mancanza immunizzazione = specificità limitata.
- b. B-2 follicolari: esprimono IgM e IgD di membrana con la stessa regione variabile (V). Sono ricircolanti perché passano da un organo linfoide 2° all'altro. Il BAFF è il fattore di sopravvivenza.

- c. B-2 marginali: esprime IgM e no IgD; esprimono CD21; situati nella milza, hanno vita breve, una limitata diversificazione e sono simili a B1.

### Selezione del repertorio B

Assicurano che solo i linfociti con BCR corretto proseguono nelle fasi maturative.

La **selezione positiva** salvaguarda i linfociti B con recettori funzionali, dotati della giusta specificità. È un processo meno definito nei B perché non sono ristretti per le molecole MHC come i linfociti T e **non è possibile distinguere** una fase di **selezione positiva**.

#### Selezione negativa

1. I linfociti B immaturi che riconoscono l'Atg self con alta affinità nel midollo osseo o milza, vanno incontro editing recettoriale della catena leggera; l'esone VkJk viene deleta si scelgono un nuovo segmento V<sub>k</sub> a monte e J<sub>k</sub> a valle.
2. Se il processo di editing non riesce a generare un corretto BCR su entrambi i cromosomi, i B possono tentare di riarrangiare la catena  $\lambda$  prima su un cromosoma e poi sull'altro.
3. Se non ha successo e i BCR riconoscono gli Atg con alta affinità i linfociti vanno incontro apoptosi. Questo processo si chiama **selezione negativa**.

### Maturazione dei linfociti T

Avviene attraverso le fasi: l'espressione dei geni per il TCR, la proliferazione cellulare, la selezione da parte dell'antigene nel timo e l'acquisizione di capacità funzionali.

#### Processo

1. Le **HSC** midollari sono orientate verso la linea T da Notch-1 e GATA-3. Esprimono CCR9 che lega CCL25 nella corticale del timo e le HSC passano nello stadio **pro-T** o **doppio -**: No TCR e no CD4 o CD8. Esprime CD44/25 e Rag1 e 2 ed inizia il riarrangiamento della catena  $\beta$  (**prima D-J** e poi V-DJ la quale avviene **nella fase pre-T!**). La proliferazione è stimolata da IL-7.
2. **Pre-T**: forma il **recettore pre-TCR** = catena  $\beta$  e **catena pre- $\alpha$  + CD3 + catene  $\zeta$** . Esprime anche CD25. Il pre-TCR stimola la proliferazione, lo sviluppo e la maturazione dei pre-T. Come detto, avviene l'unione del segmento V $\beta$  e DJ.
3. **T doppio +**: finisce la ricombinazione V-J della catena  $\alpha$  e si esprime TCR $\alpha\beta$  + CD3 + catena  $\zeta$  + CD4 + CD8. L'espressione di entrambi CD4 e CD8 è importante per il riarrangiamento dei geni per la catena  $\alpha$ . Comincia la **ricombinazione della catena  $\alpha$**  dei soli segmenti genici V-J ed esclusione della catena  $\gamma$ . 90% sono TCR $\alpha\beta$ , solo 10% scelgono la catena  $\delta$  che esclude l' $\alpha$  e fa il differenziamento in TCR $\gamma\delta$ . A sto punto cede l'espressione dei Rag si bloccano i riarrangiamenti ulteriori.  
Per sopravvivere i timociti devono **legare gli Atg self con bassa affinità** e in base

all'affinità per MHC-I o MHC-II diventano singoli +. Se non li legano vanno incontro a apoptosi per negligenza.

4. **T immaturo (singolo +):** esprimono TCR $\alpha\beta$  completo + CD4 oppure CD8. Esprimono CCR7 e legano CCL19 e CCL21 nella midollare del timo. La midollare del timo esprime il gene AIRE che fa esprimere gli Atg self. Se i singoli + legano il self vanno a apoptosi per delezione clonale o si trasformano in Treg (FoxP3+, IL 10, TGF $\beta$ ).
5. **T maturo naive:** si attiva dopo l'incontro con un Atg estraneo negli organi linfoidi secondari.

### Selezione positiva dei linfociti T

Assicurano che solo i linfociti con TCR corretto proseguono nelle fasi maturative.

La **selezione positiva** è quel processo attraverso il quale i timociti dotati di TCR che legano con bassa affinità i complessi MHC-peptidi self vengono stimolati a sopravvivere e differenziarsi in una delle due popolazioni T CD4+ o T CD8+.

1. Nella corticale timica i linfociti T doppio positivi incontrano cellule epiteliali che presentano una varietà di peptidi self legati a molecole MHC-I o II.
  2. Il riconoscimento a bassa affinità di questi complessi promuove la sopravvivenza del timocita. I timociti con recettori che non riconoscono gli Atg = apoptosi per negligenza o deprivazione.
  3. I linfociti doppio + che riconoscono i MHC-I diventano T CD8+CD4+ e i linfociti doppio + che riconoscono i MHC-II diventano T CD4+CD8-.
- La selezione negativa è un meccanismo della tolleranza centrale descritto più sotto nella pagina 35.

(Gli ultimi 4 argomenti sono preparati maggiormente dagli appunti di Xh.Gj, I.C e le slides.)

### Attivazione dei linfociti T CD8+

#### Processo di attivazione

1. Le cellule dendritiche (DC) specializzate DC1 endocitano cellule infettate o tumorali o le proteine prodotte in queste, trasferiscono gli antigeni nel citosol, li processano tramite la via di MHC-I e gli presentano ai linfociti T CD8+ naive negli organi linfoidi 2° come i linfonodi = processo di **cross-presentazione**.
2. Le **APC** esprimono la molecola **B7** che riconosce **CD28** su **T CD8+** come un secondo segnale necessario.
3. In molte infezioni virali da virus latenti che stimolano scarsamente l'immunità innata serve, il secondo segnale è fornito da T helper CD4+.
4. T CD4+ secernono citochine che stimolano la differenziazione dei T CD8+ naive ed esprimono il ligando CD40L che si lega al CD40 delle DC (licensing delle APC).
5. I T CD8+ differenziazione in CTL e sono in grado di riconoscere ogni cellula che esprime antigeni peptidici tramite MHC-I.

Le **citochine** che contribuiscono alla **differenziazione**:

- a. **IL-2**: prodotta dai T CD4+ o T CD8+, promuove la proliferazione dei T CD8+ e la differenziazione in CTL e cellule di memoria.
- b. **IL-12 e IFN di tipo 1**: Prodotte dai DC durante la risposta innata e stimolano la differenziazione dei T CD8+ naive in CTL effettori e la differenziazione dei T CD4+ in linfociti TH1.
- c. **IL-15**: prodotte dai DC, NK ecc - sopravvivenza dei T CD8+ di memoria.

**T-BET** è il fattore di trascrizione per la differenziazione in TH1 e CTL con struttura omologa a **BLIMP-1** e il **EOMES** è il fattore di trascrizione per i CTL. Tutti i 3 sono fattori di trascrizione dipendenti dal IL-2 e IL-12 e da via attivazione di JAK-STAT.

**PD-1** (Programmed cell Death protein-1), **CTLA-4**, **TIM-3** e **LAG-3** sono proteine inibitori dei CTL.

### **Ruolo dei Linfociti T helper nelle risposte immunitarie umorali**

1. Gli antigeni proteici monovalenti non sono in grado di attivare i linfociti B senza l'attività dei T CD4+.  
I linfociti T helper CD4+ attivati, attivano la risposta anticorpale dei linfociti B, dopo quest'ultimi li hanno presentato un epitopo lineare associato a molecole MHC-II, che è lo stesso antigene che è stato presentato a T helper naive dalle DC in precedenza, e dopo l'interazione tra CD40L (T) e CD40 (B).
2. I linfociti T helper follicolari (TFH) sono necessari per la formazione del centro germinativo producendo IL-21 e per il switching isotipico producendo IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , per la maturazione d'affinità e la generazione di plasmacellule di lunga sopravvivenza.

(L'argomento è molto generale e l'ho fatto maggiormente dall'Abbas 10<sup>a</sup>Ed. estraendo alcune informazioni da diversi paragrafi e dagli argomenti in continuo.)

### **Presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B ed effetto aptene carrier**

#### **Presentazione dell'antigene dei linfociti B**

1. I linfociti T CD4+ naive si attivano nelle aree T quando riconoscono gli Atg presentati dai DC.  
I linfociti B si attivano nei follicoli quando riconoscono gli stessi Atg.
2. L'attivazione contemporanea delle due cellule comporta cambiamenti che permettono la loro colocalizzazione.  
Prima del riconoscimento dell'atg:
  - T CD4+ esprimono CCR7 che lega CCL19/21 - localizzazione nelle aree T
  - B esprimono CXCR5 che lega CXCL13 - localizzazione nelle aree BDopo il riconoscimento:

- T CD4 riduce CCR7 ed esprime CXCR5 e i B riduce CXCR5 ed esprime CCR7
  - Entrambi esprimono EB12 che lega ligandi di oxisterolo, nell'interfaccia delle aree T e dei follicoli - i T e B sono attirati verso l'un l'altro.
3. I linfociti B riconoscono gli antigeni proteici, li endocitano, processano e presentano ai T-helper. Gli antigeni presentati dai linfociti B ai T-helper sono gli stessi che erano stati inizialmente presentati dalle DC ai linfociti T.
  4. In seguito all'attivazione i linfociti T helper esprimono **CD40L** che legano il recettore di CD40 espressi dai linfociti B. **CD40** cambia conformazione, viene legata da **TRAF** che innesca una via di trasduzione e attivazione di fattori trascrizionali **NF- $\kappa$ B**, i quali inducono la **proliferazione** e differenziazione a livello dei foci extrafollicolari e poi nei centri germinativi.

### Effetto aptene-carrier

2 diversi epitopi del Atg proteico:

1. **Epitopo conformazionale o epitopo espressa** della proteina **nativa** - riconosciuta ad alta affinità dal B; gli Ab verranno prodotti in base di questo epitopo.
2. **Epitopo lineare** - può derivare da qualsiasi parte della proteina nativa, generata per proteolisi che lega MHC-II e viene riconosciuta dai linfociti T.

Gli **apteni** sono equivalenti agli **epitopi conformazionali** riconosciuti dai linfociti B.

I **carrier** sono equivalenti agli **epitopi lineari** riconosciuti dai T CD4+.

Gli **apteni** sono molecole di piccole dimensioni riconosciute dagli anticorpi ma di per sé non sono immunogeni. Se l'aptene si coniuga a una proteina carrier, il carrier è in grado di indurre una risposta anticorpale verso l'aptene.

3 caratteristiche delle risposte anticorpali ai coniugati aptene-carrier:

1. Tali risposte richiedono la presenza sia dei linfociti B, specifici per l'aptene sia per i linfociti T, specifici per il carrier proteico.
2. L'aptene carrier devono essere fisicamente legati, per stimolare efficacemente la risposta.
3. L'interazione è possibile solo tra i linfociti T helper CD4+ e i linfociti B che esprimono MHC-II.

(L'argomento è preparato maggiormente dal Abbas 10<sup>a</sup> Ed. pag.279-280)

## Reazione del centro germinativo

I centri germinativi sono strutture organizzate in cui si creano nei follicoli linfoidi durante le risposte immunitarie T-dipendenti, distinte in:

- Zona **scura** - linfociti B in rapida proliferazione o centroblasti
- Zona **chiara** - i linfociti B ad alta affinità o centrociti



La **reazione del centro germinativo** è il processo di differenziazione dei linfociti B e di selezione delle cellule dotate di recettori per l'antigene di **elevata affinità**.

La reazione prevede alcuni passaggi sequenziali:

1. **Formazione del centro germinativo** da parte di linfociti T Helper Follicolari (THF) - migrano nel follicolo esprimendo **CXCR5** che lega **CXCL13** nei follicoli.
  2. I **linfociti B** attivati dall'interazione **CD40- CD40L** nei foci extrafollicolari, riducono l'espressione di EB12 e si spostano nel follicolo per formare il centro germinativo - formato anche da soli 100 cellule!
  3. Gli stessi linfociti B attivati formeranno la zona scura del C.G. I B fanno proliferazione intensa, in 5 giorni ogni cellula darà origine a 5000 cellule.
  4. **Ipermutazione somatica**: I linfociti B della zona scura vanno incontro a mutazione dei geni per le regioni V delle Ig ad opera di enzima **AID**.
  5. **Migrazione dei B** all'interno del centro germinativo: le cellule mutate e che hanno smesso di proliferare perdono l'espressione di CXCR4 che lega CXCL12 nelle zone scure. Esprimono **CXCR5** legando **CXCL13** che è presente nelle **zone chiare** dove si trovano anche FDC e linfociti THF.
  6. **Selezione dei linfociti B ad alta affinità**: nella zona chiara i linfociti andati contro ipermutazione somatica sono **testati** per la loro capacità di riconoscere Atg solubili presentati dai FDC. I linfociti B che hanno acquistato un recettore ad **alta affinità** hanno più probabilità di catturare l'antigene e **presentarlo** ai linfociti THF e differenziarsi. Quelli che non completano la selezione vanno incontro a morte.
  7. I linfociti B selezionati positivamente esprimono il **fattore di trascrizione MYC**, esprimono CXCR4 e ritornano nella zona scura e possono subire **ripetuti cicli di mutazione e selezione**, migrando ripetutamente tra la zona chiara e scura.
  8. Dopo alcuni cicli di selezione i linfociti B ad alta affinità, riesprimono EB12, escono dal centro germinativo come **plasmablasti** e migrano nel midollo osseo dove differenziano in plasmacellule a lunga sopravvivenza.
  9. I linfociti B che hanno assunto una **bassa ipermutazione somatica** e rimangono come linfociti B relativamente a **bassa affinità** escono prima dal centro come **cellule B della memoria**, i quali possono ricircolare in altri tessuti linfoidei 2°.
- (L'argomento è preparato maggiormente dagli appunti di I.C)

### **Scambio di classe (isotipico) della catena pesante dell'anticorpo**

Nelle risposte T-dipendente una parte della progenie di cellule B attivati che esprimono IgM e IgD va incontro a scambio di classe, per produrre Ab di classe diversa ( $\gamma$ ,  $\alpha$  ed  $\epsilon$ ). Può avere inizio all'**esterno del follicolo** da parte di THF extrafollicolari e **proseguire** nei **centri germinativi** dai linfociti THF della zona chiara.

I linfociti B modificano gli isotipi degli anticorpi che producono **cambiando** le **regioni costanti** delle catene pesanti e mantenendo **inalterata** la specificità per l'antigene,



processo regolato dalle citochine prodotte dai linfociti T helper attivati da diversi tipi di patogeni.

1. **Lo scambio da IgM a IgG** caratterizza le risposte T-dipendenti nei confronti di **batteri** e **virus**. I linfociti THF esprimono IL-21 più che IL-4 responsabile dello scambio. IgG promuovono la fagocitosi dei microbi opsonizzati e attivano il complemento.
2. **Lo scambio da IgM a IgE** caratterizza le risposte T-dipendenti contro gli **elminti**. I linfociti THF esprimono le citochine dei TH2 (IL-4 e IL-13) responsabili dello scambio.
3. **Lo scambio da IgM a IgA** caratterizza le risposte dei linfociti B nelle sedi anatomiche dove risiedono, es.: **MALT**. Molti tipi di cellule, anche T-helper esprimono TGF- $\beta$ , BAFF e APRIL responsabili dello scambio. Vuol dire che questo tipo di scambio può essere T-indipendente.

L'attivazione da parte di **CD40** coopera con l'azione delle citochine nell'indurre lo scambio e causa anche l'**attivazione** dell'enzima **AID**.

Il meccanismo molecolare dello scambio è un processo di ricombinazione in cui la regione del DNA che codifica per la catena pesante delle Ig viene tagliata in modo tale per il cui l'esone VDJ che codifica il dominio V viene posto accanto a una regione C più a valle (più in direzione 3') e il DNA interposto viene eliminato. (figura 12.14 10<sup>a</sup> Ed. pg.287)

1. Questi eventi di ricombinazione prevedono **sequenze nucleotidiche definite** con DNA ricche di sequenze GC nelle regioni di scambio (S), posti negli introni tra le regioni J e C al 5' di ogni locus C<sub>H</sub>.
2. A monte (a 5') di ogni regione di scambio è presente l'**esone I**, **iniziatore** della trascrizione preceduto da una regione promotrice.
3. Le citochine avviano lo scambio di classe attivando la trascrizione a partire dal promotore di una determinata **regione I**, della regione di scambio (**S**) e dell'**esone C<sub>H</sub> adiacente**. Questi sono trascritti germinativi non tradotti in proteine ma sono necessari per l'inizio dello scambio isotipico. Quindi, abbiamo la formazione anche di una catena di RNA complementare per sti trascritti.  
(Per il 4° e 5° punto si devono definitivamente guardare le foto 12.14 e 12.15. pg 287-288. Se riesci a capire senza di loro, sei un genio!)
4. I **trascritti germinativi** si osservano sia **a livello del locus  $\mu$**  (nello scambio di IgM) sia a valle del **locus della catena pesante** coinvolta nello scambio di classe. La porzione di DNA nella regione di scambio a monte  $\mu$  è unita a quello di ricombinazione a valle permettendo che l'esone VDJ riarrangiato subito adiacente alla regione di scambio  $\mu$  si ricombini con il gene della catena pesante Ig, trascrizionalmente attiva che si trova immediatamente dopo la regione di scambio più a valle.
5. Le citochine determinano anche quale regione C<sub>H</sub> debba essere coinvolta nella formazione del trascritto germinativo.

**Esempio:** IL-4 induce prima la trascrizione del locus I $\epsilon$ -S $\epsilon$ -C $\epsilon$  che porta la

produzione di **trascritti germinativi**  $\epsilon$  in una cellula che produce IgM e poi alla ricombinazione delle regioni di scambio  $S_{\mu}$  e  $S_{\epsilon}$ .

La regione di DNA inframezzata viene persa e l'esone VDJ è portata in prossimità di  $C_{\epsilon}$ . Questo processo determina la produzione di IgE che contengono lo stesso dominio variabile (V) presente nelle IgM originarie.

6. I trascritti delle regioni di scambio formano un legame stabile DNA-RNA e lasciano libero l'altro filamento a formare un loop, il R-loop.
7. **AID** è un enzima che **riconosce solo DNA a singola catena** come R-loop e **rimuove** il gruppo amminico dalle citosine delle catene a singola elica del DNA, **convertendo** la citosina in uracile. (Le regioni di scambio sono ricche in GC).
8. L'enzima N-glicosilasi (**UNG**) rimuove residui U generando un sito abasico.
9. L'endonucleasi (**APEI**) taglia i siti abasici, creando un filamento discontinuo.
10. Dopo che il RNA si distacca, AID, UNG e APEI generano tagli anche sull'altro filamento.
11. I tagli prodotti possono essere coinvolti nello scambio isotipico. La DNA non necessaria tra le due regioni di scambio viene eliminata.
12. Il DNA viene riparato e unito per ligazione e a questo punto la regione variabile riarrangiata viene fusa con la nuova regione costante.

#### Riassunto

Gli eventi dello scambio di classe avvengono nei **regioni di scambio S**

Esone I, esone S e l'esone  $C_H$  - **trascritti germinativi**. Più a monte abbiamo il VDJ.

L'altra catena di DNA forma il R-loop, riconosciuta da AID - sostituisce C con U.

UNG rimuove gli U, generando siti abasici e APEI taglia questi siti. AID, UNG e APEI

fanno la stessa cosa sull'altro filamento dopo il distacco di RNA. La VDJ si unisce con il  $C_H$ . IgM  $\rightarrow$  IgG - ✂ batteri e virus; IgM  $\rightarrow$  IgE - ✂ elminti; IgM  $\rightarrow$  IgA - MALT

### Differenziazione in plasmacellule

**Premessa:** L'argomento è spiegato in buon dettaglio negli argomenti precedenti: la presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B ed effetto aptene carrier, la reazione del centro germinativo e del scambio di classe (isotipico) della catena pesante dell'anticorpo. Quindi, ho solo fatto una revisione dell'argomento del materiale della prova scritta di 38 domande.

Le plasmacellule sono **linfociti B** destinati alla produzione di grandi quantità di **anticorpi**.

#### Attivazione dei linfociti B naive

1. Le **DC** esprimono **B7-1 e B7-2** che interagiscono con **CD28** espresse dalle cellule T- naive e quindi **T-helper** si attivano e proliferano e producono **CD40L**.
2. Sia i linfociti T che i linfociti B vengono attivati dallo stesso antigene e cambiano il loro profilo di espressione di recettori per le chemochine contemporaneamente perché si dirigono uno verso l'altro. I linfociti T esprimono CXCR5 per CXCL13 e i linfociti B esprimono CCR7 per CCL19 e CCL21.

3. I linfociti T helper attivati esprimono CD40L il ligando per il recettore dei linfociti B CD40. I **linfociti B** che hanno incontrato i T helper nella zona di margini del follicolo **vengono attivati** da **CD40L** e poi ritornano all'interno del follicolo dove avviene scambio delle classe, mutazioni ipersomatiche e selezione che portano alla **maturazione dell'affinità delle Ig** e alla generazione dei linfociti B di memoria.

### Le reazioni del centro germinativo

1. All'interno del centro germinativo è presente una zona scura popolata da linfociti **B proliferanti**. Questa zona non contiene cellule dendritiche follicolari né linfociti T. Qui avviene lo **scambio isotipico** e **maturazione dell'affinità**.
2. Una piccola quantità di linfociti B che hanno smesso di proliferare migra invece verso la zona chiara dove viene a contatto con i prolungamenti citoplasmatici delle FDC e con i linfociti Th follicolari. Questa è la zona dove avverranno i successivi **eventi di selezione e differenziazione**.
3. Il processo di differenziazione porta alla generazione di **linfociti B** che **secernono anticorpi**. Questo processo comporta anche un aumento della produzione di Ig e il passaggio delle Ig dalla forma di membrana a quella secreta.
4. Il cambiamento della produzione di Ig alla forma secreta deriva da **cambiamenti all'estremità C-terminale** delle catene pesanti delle Ig (scambio isotipico). Le citochine in questo processo determinano il tipo di catena che verrà selezionata ad **esempio**, la **IL- 4** induce la trascrizione dei geni per le **catene  $\epsilon$**  e quindi indicano la produzione di **IgE** mentre **IFN- $\gamma$**  induce la produzione di **IgG2a**. IgA invece è stimolata da **TGF- $\beta$** .
5. La produzione di plasmacellule dipende da BLIMP-1.
6. Le plasmacellule sono 2 tipi: lunga e breve sopravvivenza:
  - a. **Breve**: originano nelle foci extrafollicolari nel corso delle risposte **T-indipendente** e durante la fase precoce T-dipendente. Localizzati negli organi linfoidi secondari e negli organi non linfoidi periferici.
  - b. **Lunga**: generate in risposta **T-dipendente** ad **Atg proteici**, durante la reazione del centro germinativo. A questo processo cooperano l'attivazione del BCR e del recettore di IL-21.  
I plasmablasti (precursori di plasmacellule) generati nei centri germinativi entrano nel circolo e si dirigono verso il midollo osseo, dove si differenziano in plasmacellule a lunga sopravvivenza, i quali **secernono anticorpi e esprimono CD20**.  
La **sopravvivenza** di queste cellule viene sostenuta dalle **citochine BAFF**.

## Vie di attivazione del complemento

Il sistema di complemento è un **meccanismo effettore** dell'immunità umorale e innata. Il plasma dei vertebrati contiene alcune proteine con proprietà di **sequenzialità**, **amplificazione** ed **inattivazione** che svolgono una determinata funzione chiamati **sistemi d'attivazione**, es.: il **sistema del complemento**, composto da **30 proteine circolanti**:

- agiscono a livello di una m.cellulare (uscita del contenuto cellulare - morte)
- attività solo nelle zone di innesco
- emivita di msec e sono regolati da inibitori.

Tre vie di attivazione: classica, alternativa e lectinica

### Via classica - immunità adattativa

- Innescata da **immunocomplessi** (IC) che possono essere **solubili**, associati a **membrane cellulari** o a **matrice extracellulare**.
- 21 proteine coinvolte
- Riconoscimento del dominio **CH2** di IgG1 e IgG3 e il dominio **CH3** del IgM
- L'enzima chiave = C1 - attività proteasica:
  - ❖ **C1q**: lega l'Ab; complesso multimerico formato da **6 subunità** disposte radialmente con una testa globulare (H) simile al collagene  
Associato a due domini di C1r e C1s (serin proteasi) e formano il tetramero C1r<sub>2</sub>s<sub>2</sub>. Il legame di C1q con 2 Ab attiva il C1r
  - ❖ **C1r** cliva C1s attivandola
  - ❖ **C1s** cliva C4
- Ogni Fc presenta solo **un sito di legame** per C1q.
- C1q viene **attivata** solo se lega **2 Fc contemporaneamente**
- Affinché le IgG attivino C1q le Fc debbano essere vicino - Il motivo perchè IgM pentamerica è più efficace.
- Gli Ab liberi non leggono C1q; in questa conformazione i Fc sono inaccessibili


### Sequenza:

1. C1s cliva il C4 in C4a e C4b; **C4a** viene rilasciata
2. **C4b** lega covalentemente all'Atg o all'immunocomplesso
3. La componente C2 ha una forte tendenza di complessare con C4b.  
Una volta legata C1s cliverà producendo **C2b** (liberata con funzione ignota) e **C2a** più grande generando il complesso:
4. **C4b-2a = C3 convertasi**; cliva C3 in **C3a** (fase solubile, anafilotossina e chemoattrattante) e **C3b** legata covalentemente generando il complesso:
5. **C4b-2a-3b = C5 convertasi**; cliva C5 in **C5a** (anafilotossina) e **C5b** generando:
6. C4b2a3b5b - fasi tardive del complemento e formazione di **MAC**.

### Via alternativa - immunità innata

- Attivazione solo se C3b è legato alla superficie di un patogeno/cellula infetta o alterata e non sulla membrana dell'ospite, in assenza di anticorpi.
- Lega batteri gram +, gram - (LPS), funghi e lieviti, alcune cellule infettate da virus e parassiti (Trypanosoma)

### Sequenza

1. Attivazione spontanea di C3 in condizioni fisiologiche con formazione di bassi livelli di C3b e C3a (processo di tickover ).
- a. C3 presenta un **gruppo tioesterico** fortemente reattivo (inaccessibile)  
Dopo clivaggio (rimozione di C3a) il gruppo tioesterico diventa accessibile e può formare legami covalenti con il patogeno.
- b. Se questo legame non si forma il gruppo viene inattivato per idrolisi.
- c. C3b legata alla superficie del patogeno permette l'opsonizzazione dei patogeni favorendone la fagocitosi da fagociti che presentano il recettore per C3b, il **CR1**.
- d. Il mancato legame di C3b al patogeno porta alla sua inattivazione.
2. Se C3b lega la superficie del patogeno favorisce il legame con il **fattore B**.
3. Il complesso C3bB si cliva dal **fattore D** generando:
4. **C3b-Bb = C3 convertasi**: up-regolato dal **Properdina** (l'unico regolatore positivo) la quale aumenta molto la quantità di C3b; amplificano l'attivazione del complemento indipendentemente dalla via iniziale d'attivazione (es.:classica)
5. **C3b-Bb-C3b = C5 convertasi**, cliva C5 in C5a e C5b e iniziano le fasi tardive.
6. L'attivazione stabile non si verifica a livello di m.cellulari dell'ospite, dall'azione di proteine regolatrici, non espressi dai microorganismi.

### Via lectinica- immunità innata

- Si attiva per l'interazione di polisaccaridi microbici con lectine circolanti in assenza di anticorpi.
- Lectine: proteine che legano gli oligosaccaridi prodotte durante la risposta infiammatoria (proteine di fase acuta), prodotte sull'azione di Il-6
- Enzimi chiave = MBL (Mannose Binding Lectin) o ficolline (H o L) = Collectine
  - ❖ Sono legati a MASP (MBL Associated Serine Protease)
  - ❖ MBL ha struttura omologa a C1q, e MASP-1 e 2 a C1r e C1s.
- MASP-2 è la proteasi che cliva il componente C4 e C2 formando:
  - MBL-C4b-2a = C3b convertasi
  - MBL-C4b-2a-3b = C5b convertasi

### Sequenza terminale dell'attivazione del complemento

1. La C5 convertasi genera C5a (fase fluida) e C5b che si associa ai complessi preformati C6, C7, C8, C9 senza attività proteasica.

2. C5b lega C6 e C7; la porzione idrofobica di C7 si inserisce nello strato lipidico agendo da recettore ad alta affinità per il C8.
3. Il C8 è un trimero, con due catene lega C6 e C7 e con una catena idrofobica si inserisce nello strato lipidico, stabilizzando il complesso C5b-6-7
4. Il complesso C5b-8 lega il C9 = formazione di MAC (Membrana Attack Complex)
5. C9 tende a polimerizzare formando pori da 100 µm che fanno entrare H<sub>2</sub>O e ioni - rigonfiamento cellulare - lisi osmotica.

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #5 e Abbas pg.307)

## Funzioni dei recettori per il complemento

Molti degli effetti biologici del complemento sono dovuti al legame dei suoi frammenti con i recettori espressi da diverse cellule, con **funzioni**:

1. Promuovere la opsonizzazione e fagocitosi
2. Promuovere la lisi dei microorganismi o cellule alterate
3. Stimolare l'infiammazione
4. Fornire il segnale accessorio per l'attivazione dei linfociti B (es.: CR2 agisce da costimolatore per aumentare la risposta contro Atg)

### CR1

**Specificità:** C3b, C4b

**Cellule esprimenti:** Eritrociti, monociti, leucociti PMN (polimorfonucleati), B, T e FDC

**Funzioni:**

1. **Fagocitosi** di Atg **opsonizzati** da C3b e C4b
2. **Eliminazione** di **immunocomplessi** circolanti, fissandoli sugli eritrociti che li trasportano al fegato e milza
3. Amplificazione della funzione negli cellule che esprimono FcγRI (R per IgG) e i macrofagi che esprimono IFN-γ
4. Regola l'attivazione del complemento

### CR2

**Specificità:** C3d, C3dg, iC3b (prodotti dal clivaggio dal fattore I) EBV

**Cellule esprimenti:** Cellule B e FDC

**Funzioni:**

1. Stimola la risposta umorale. Nei **linfociti B**:
  - a. favoriscono l'intrappolamento degli Atg nei centri germinativi
  - b. Viene espressa con CD19 e TAPA-1 e serve come co-recettore per il BCR potenziando la **risposta agli Atg** opsonizzati con C3d - ruolo nella **selezione** di linfociti B ad alta affinità.
2. Funge da recettore per Epstein-Barr Virus (**EBV**)

### CR3

**Specificità:** recettore integrinico di iC3b

**Cellule esprimenti:** Macrofagi, i PMN, mastociti, NK, FDC

**Funzioni:**

1. Eterodimero CD11b-CD18 o MAC-1, un recettore integrinico per iC3b promuovendo la fagocitosi di patogeni opsonizzati da sto frammento.
2. Lega ICAM-1 espressa dall'endotelio favorendo l'**adesione** stabile dei **leucociti** anche senza l'attivazione del complemento

**CR4**

**Specificita:** iC3b

**Cellule esprimenti:** Macrofagi, i PMN, NK, FDC

**Funzioni:**

1. Eterodimero CD11c-MAC-1, recettore integrinico per iC3b promuovendo la fagocitosi di patogeni opsonizzati; simile a CR3
2. CD11c è un marcatore delle DC.

**CRlg**

1. Recettore del complemento della famiglia Ig
2. Espresso dalle cellule di Kupffer del fegato - fagocitosi dei microrganismi opsonizzati da C3b e iC3b

**Il recettore per il C5a**

Associato a proteine G presente sui macrofagi, PMN, mastociti, endoteli ecc.

**Funzioni di C5a:**

- **Promuove l'infiammazione** burst-ossidativo con liberazione di ROS
  - Azione chemiotattica sui neutrofili
  - Aumento la permeabilità dell'endotelio
  - Aumento dell'espressione del di molecole d'adesione sull'endotelio
  - Il più potente induttore della degranulazione mastocitaria
- C3a, C4a e C5a sono anafilotossine** - promuovono il rilascio di fattori vasoattivi

**Recettori che regolano il sistema del complemento (C)**

**C1 INH**

**Funzione:**

1. **Inibitore della serina proteasi** che compete con il substrato C1r2s2
2. Il clivaggio di C1 INH da parte di C1r2s2 porta al distacco del complesso C1q, bloccando l'attivazione del C.
3. Inibisce altre serin proteasi, callicreina e fattore XII di Hageman (infiam.acuta)
4. Not-fun fact: La sua deficit causa malattia autosomica dominante edema neuroangiotico ereditaria.

**Fattore I**

**Funzione:** Inibizione di C3 convertasi

- ★ **DAF, MCP, CR1, C4BP e fattore H** agiscono da **cofattori** per il fattore I - dissociazione di C4b-2a e C3b-Bb. Il fattore I cliva i C3b generati in eccesso



generando iC3b, C3d e C3dg, i quali non hanno funzione regolatoria ma restano attaccati alla membrana del patogeno e si riconoscono dai B e T.

### Inibizione di formazione di MAC

1. **CD59**: Espressa solo da cellule e non patogeni  
Funzione: Può legare il complesso C5b-C8 prevenendo l'assemblaggio di C9
2. **Proteina S**: proteina plasmatica che lega il complesso C5b-C7 prevenendo l'inserimento nello strato lipidico e danno delle cellule non interessate all'attivazione del complemento.

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #5 e Abbas tabella 13.8 e 13.9 pag.315-316)

## Tolleranza centrale dei linfociti T

I meccanismi responsabili della tolleranza = **eliminazione** o **inattivazione** dei **linfociti** che esprimono recettori **ad alta affinità** per l'**Atg self**.

I soli linfociti T utili sono quelli specifici per peptide estranei presentati da molecole MHC-self.

La tolleranza al self può essere generata nei:

1. linfociti autoreattivi **immaturi** presenti negli organi linfoidi 1° (**tolleranza centrale**)
2. linfociti **maturi** nei tessuti periferici 2° (**tolleranza periferica**)

Durante la maturazione timica, i linfociti T immaturi riconoscono antigeni self con:

- **alta affinità**, i linf.T vanno incontro apoptosi = **selezione negativa** mediata dalle DC o cellule midollari timiche nelle cellule T:
  - **doppio positive** CD4+CD8+ nella regione **corticale**
  - **singole positive** nella regione **midollare**
- **bassa affinità**, i linf.T vanno incontro morte per negligenza = **selezione positiva**

Nella midollare le cellule timiche esprimono una proteina **AIRE** (Autoimmune Regulator) che induce nel timo l'espressione di geni tessuto-specifici - rende possibile durante la selezione negativa l'espressione di antigeni specifici in altri tessuti ma normalmente assenti nel timo.

Alcuni dei linfociti T CD4+ autoreattivi che sopravvivono la selezione danno origine ai T regolatori o **Treg** = prevenzione di reazioni autoimmunitarie.

(L'argomento è preparato maggiormente dalle slides #10)

## Tolleranza periferica dei linfociti T

I meccanismi della tolleranza periferica dei linfociti T sono anergia, inibizione da Treg e delezione - mantengono tolleranza dei linfociti T verso Atg self in diversi tessuti specialmente verso quelli scarsamente rappresentati a livelli timico.



### 1. **Anergia** (mancata responsività)

L'esposizione prolungata del linfocita T ad un antigene porta ad anergia in caso di:

- a. **Espressione minore del TCR**; la trasduzione viene bloccata e nel complesso TCR si reclutano tirosin fosfatasi (inibizione)
- b. **Assenza** di riconoscimento dei segnali **costimolatori** (es. B7) attiva ligasi (CBL-b) = ubiquitina le proteine legati al TCR e li indirizza alla degradazione nei proteasomi o lisosomi
- c. **Mancanza** di attivazione dell'immunità **innata** - reclutamento dei **recettori inibitori della famiglia CD28** che bloccano l'attivazione dei linfociti T:
  - **CTLA-4**: compete per il B7-1 con il recettore attivatorio CD28  
Espressa dai Treg e transitoriamente dai T recentemente attivati  
Lega B7 espresse su APC ingerendoli (**transendocitosi**).  
Contiene code citoplasmatiche che attiva la **clatrina**, coinvolta nell'endocitosi.  
L'inibizione di questo punto di controllo si chiama **checkpoint inhibition**. **Es.**: Ab anti-CTLA-4 - trattamento dei melanomi avanzati.
  - **PD-1** altro recettore inibitorio della famiglia CD28. Riconosce:
    - **PDL-1** è espresso da APC in diversi tessuti. Il legame ad entrambi i ligandi porta **fosforilazione** di un motivo **ITIM** e **ITSM** (motivo di scambio) nella coda citoplasmatica. I motivi legano la **fosfatasi SHP2** che rimuove gruppi fosfati dai substrati attivatori.
    - **PDL-1** è espresso da APC di origine midollare

### 2. **Inibizione da parte di Treg**

I marcatori fenotipici di Treg: **CD4+**, **FOXP3+** (fattore trascrizionale) ed alti livelli della catena  $\alpha$  di IL-2 (CD25) - utilizzano IL-2 e non IL-7 come fattore di crescita e di sopravvivenza. Meccanismi di inibizione:

- a. **Inibizione della costimolazione esprimendo CTLA-4**
- b. **Produzione** di citochine immunosoppressive. **IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$** 
  - TGF- $\beta$  inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei T e macrofagi e stimola la proliferazione di Treg.
  - IL10 è un regolatore da feedback negativo che **inibisce la produzione di IL-12** ed di IFN- $\gamma$  e l'espressione di MHC-II negli APC
- c. **Consumo di IL-2**: l'elevata espressione dei recettori per IL-2 **depriva altre popolazioni cellulari** immuni che dipendono da IL-2

### 3. **Delezione dei linfociti T mediante apoptosi**

Per i linfociti T che riconoscono gli Atg self ad elevata affinità e che sono ripetutamente stimolati da Atg persistenti. 2 vie di apoptosi:

**a. Via mitocondriale o intrinseca**

I sensori di stress cellulare (**BIM**) lega 2 proteine effettrici della famiglia BCL-2 come **BAX** e **BAK** che si inseriscono nella membrana mitocondriale e causano **aumento della permeabilità mitocondriale**. Molti componenti escono nel citosol, es.: **citocromo C** attiva la **caspasi-9** che attiva le caspasi e vallo i quali **frammentano la DNA**

**b. Via dei recettori di morte o estrinseca**

Attivazione dei **recettori di TNF** i quali reclutano proteine adattatrici che attivano la **caspasi-8** - caspasi a valle - **frammentazione del DNA**

(L'argomento è preparato maggiormente dagli appunti di I.C pag.247-254)

### **Tolleranza centrale dei linfociti B**

La tolleranza dei linfociti B = evitare la responsività agli antigeni polisaccaridici e lipidi. La tolleranza centrale avviene durante la maturazione nel midollo osseo dei linfociti B che esprimono IgM come recettore per gli antigeni. Il riconoscimento ad alta affinità di un antigene self porta alla **delezione del linfocita B** o al **cambio della sua specificità**.

3 meccanismi:

**1. Editing recettoriale**

Il riconoscimento degli antigeni self multivalenti nel midollo, i quali possono legare ed aggregare contemporaneamente più recettori causa innescare una forte segnale d'attivazione.

I linfociti B immaturi riattivano i geni RAG1 e RAG2 e fanno una nuova ricombinazione VDJ della catena leggera  $\kappa$  delle Ig = catena di nuova specificità. Se i ricombinazioni di catena  $\kappa$  falliscono si fanno riarrangiamento della catena  $\lambda$

**2. Delezione:** è probabile che avvenga in caso l'editing recettoriale fallisce.

Apoptosi simile alle cellule T nel timo ma non ben definita per i B.

**3. Anergia:** Se i B riconoscono gli Atg self con bassa affinità vengono inattivati.

### **Tolleranza periferica dei linfociti B**

Avviene in caso i linfociti B maturi che riconoscono gli Atg self nei tessuti periferici.

La costimolazione dei T helper manca in caso di **peptidi non proteici** o in caso le cellule B sono rese anergiche o sono state delete in caso di **antigeni proteici**.

3 meccanismi:

**1. Anergia;** I linfociti B autoreattivi che vengono stimolati ripetutamente da antigeni self diventano incapaci di rispondere a stimolazioni successive. I B anergici necessitano il fattore di crescita BAFF di sopravvivere e non riescono a competere con i B naive per questo fattore - vengono eliminati.

**2. Delezione;** attivazione della via mitocondriale - apoptosi

3. **Ruolo dei recettori inibitori**; Es.: CD22 si lega all'acido sialico presente nelle proteine di superficie dei B. Nella coda citoplasmatica presenta motivi ITIM che attivano i fosfatasi.
4. **Regolazione dei linfociti B** da parte dei T<sub>FR</sub> o Treg follicolari - entrano nei follicoli linfoidi e attenuano i segnali di attivazione che i linfociti T forniscono ai linfociti B nel centro germinativo.  
(L'argomento è maggiormente preparato dal libro pag.365-366)

## Ipersensibilità di tipo I

### Ipersensibilità immediata o di tipo I - allergie/atopie

Mediata dalle **IgE specifiche** per **Atg proteici** ambientali non microbici, gli **allergeni** = sostanze chimiche proteiche presenti nel polvere, cibi e pelli legate a proteine self che generano risposte T-dipendenti, senza attivare l'immunità innata.

⚠ **Attenzione**: Le allergie sono solo T CD4+ dipendenti.

### Eziopatogenesi

1. L'attivazione ripetuta dell'immunità adattativa senza immunità innata indirizza i T CD4+ verso TH2 - producono IL-4, IL-5 e IL-13 = attivazione dell'infiammazione locale.
2. I TH follicolari producono IL-4 ed indurre la differenziazione dei B in plasmacellule producono IgE.
3. Le IgE si legano ai recettori FcεRI dei mastociti ed eosinofili e li rivestono (sensibilizzazione) pronti a reagire al successivo esposizione all'Atg.
4. Nelle successive esposizioni avviene l'aggregazione dei FcεRI che hanno legato gli Atg, i mastociti si attivano e degranulano sostanze vasoattive e spasmogene:  
Tryptasi - degrada FBNG  
Chimasi - converte l'angiotensina I in angiotensina II - produzione di muco  
Leucotrieni - rossore tumefazione citochine  
Prostaglandine, IL-1/4/5/6/13 TNF - richiamo neutrofili  
PAF- fattore di aggregazione piastrinico - vasodilatazione e broncospasmo  
Le persone allergici producono IgE e le persone sane producono IgG o IgM.

### Quadro clinico

Segni principali: vasodilatazione, aumento della permeabilità vasale, broncocostrizione

- **Reazione immediata**: dai mastociti; in risposta di inoculo intradermico dell'allergene si crea un tumefazione - pomfo e i vasi nei margini del pomfo si dilatano causando eritema che dura meno di un'ora. Altri: dolore addominale, diarrea, congestione nasale. Sintomi che si manifestano entro pochi minuti.
- **Reazione tardiva**: dai neutrofili, eosinofili, macrofagi, basofili, TH.
  - Gli TH2 secernono citochine: IL-4 induce l'esposizione al VCAM-1 sull'endotelio che promuove il reclutamento degli eosinofili e altri TH2

- Gli eosinofili rilasciano la proteina basica maggiore e la proteina cationica che distruggono l'epitelio, i quali contengono anche idrolasi, perossidasi, leucotrieni, prostaglandine.
- Si manifesta tra 2-4 ore e può verificarsi anche senza quella immediata.

Gli manifestazioni principali:

### **Anafilassi**

Reazione di ipersensibilità immediata sistemica caratterizzata da edema diffuso e ipotensione: La forma più grave di una allergia.

### **Patogenesi**

Attiva i mastociti ovunque con rilascio massivo di mediatori che portano broncocostrizione, asfissia, collasso cardiovascolare, perdita del tono vasale e perdita di plasma - shock anafilattico - morte

**Terapia d'obbligo:** adrenalina per via sistemica o antistaminici

### **Asma bronchiale**

Malattia infiammatoria dovuta ad ripetute reazione della fase tardiva dell'ipersensibilità di tipo I al polmone che causano la triade:

1. Episodi reversibili ma intermittenti di ostruzione delle vie aeree
2. Infiammazione bronchiale cronica con eosinofilia
3. Iper-trofia delle cellule muscolari lisce bronchiali con iper-reattività ai broncocostrittori.

**Rinite allergiche:** edema della mucosa della vie aeree associato ad infiltrazione eosinofila con difficoltà respiratorie, ipersecrezione di muco, tosse; spesso associata ad congiuntivite allergica con rossore e prurito degli occhi.

**Orticaria:** reazione pomfoide acuta indotta dai mediatori come istamina dei mastociti dopo contatto cutaneo con l'allergene o o dopo il suo ingresso nel circolo

**Dermatite atopica** ed eczema: reazione della fase tardiva ad un allergene. TNF, IL-4 agiscono sull'endotelio e promuovono l'infiammazione. **Terapia:** corticosteroidi

## **Ipersensibilità di tipo IV**

**L'ipersensibilità di tipo IV** è causata dai linfociti T:

- **T CD4+** (TH1 e TH17): prod. di IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF - infiammazione e reclutamento dei neutrofili e macrofagi
- **T CD8+**: citotossicità cellulare

Malattie causate dalle citochine **IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF**

Molte malattie autoimmuni organo-specifici sono causate da T autoreattivi agli Atg self.

### **1. Sclerosi multipla**

Malattia autoimmune del SNC in cui i **TH1** e **TH17** reagiscono contro Atg self proteici di **mielina** causando infiammazione e degradazione di mielina da fagocitosi; anomalie nella conduzione nervosa e **deficit neurologici**.

2. **Artrite reumatoide:** L'antigene è il **collagene**. Patologia infiammatoria che coinvolge gli **articolazioni piccole** dell'estremità e quelle **grandi** come spalla, ginocchio; infiammazione della sinovia e distruzione:
  - ❖ del **cartilagine articolare** - TH1 e TH17 reclutano IL-1, IL-8, IL-17, IFN-TNF che reclutano i leucociti i quali attivano le **cellule sinoviali** a produrre **collagenasi** ed enzimi proteolitici.
  - ❖ dell'**osso** - i linfociti T producono **RANK** che attiva gli **osteoclasti**. Presenza di autoanticorpi specifici come anti-citrullina e il fattore reumatoide.
3. **Diabete mellito di tipo I**  
Malattia metabolica multisistemica causata da un alterato metabolismo dell'**insulina**. Dovuta ad una risposta contro Atg self nelle cellule  $\beta$  del pancreas e distruzione di sti cellule dai CTL - deficit insulinico - iperglicemia.
4. **Psoriasi:** Malattia infiammatoria dove i linfociti autoreattivi riconoscono atg self cutanei.
5. **Sensibilità da contatto:** malattia infiammatoria dovuta ad un **aptene-carrier**. Le proteine ambientali servono da aptene per formare un neoAtg riconosciuto dai T. **Rash cutaneo** che può cronicizzare in **eczema**.
6. **DTH** (Delayed Type Hypersensitivity) Ipersensibilità ritardata - si manifesta dopo **24-48 ore** dopo l'incontro con l'antigene.  
Reazione infammatoria lesica dovuta all'azione di TH1. Si sviluppa in risposta ad infezioni microbiche o sensibilizzazione da sostanze chimiche e Atg ambientali.  
**L'esordio classico:**
  - a. **Dopo 4 ore** nei soggetti sensibilizzati si ha il reclutamento **dei neutrofili**.
  - b. **Entro 12 ore** arrivano i **monociti e linfociti T**, le cellule endoteliali si rigonfiano, si **aumenta la permeabilità vasale** con fuoriuscita di plasma, leucociti e **fibrinogeno** che si trasforma in fibrina - **edema ed indurimento dopo 18 ore**.
  - c. Si può cronicizzare se i macrofagi attivati di TH1 non eliminano il microbo e la presenza persistente delle citochine causa un'attivazione **costitutiva** dei linfociti e macrofagi che si ingrandiscono in **cellule giganti plurinucleate**. Se i microbi sono localizzati in un'area ristretta la reazione forma i **granulomi** come tentativo di contenere l'infezione ma può causare gravi danni anatomici e funzionali in base alla sede.

**Malattie causate da CTL:** Citotossicità e danno tissutale nelle cellule infettati da virus anche se il virus non è citopatico. Come menzionate distruggono anche le cellule  $\beta$  di pancreas contro Atg self.

(Gli argomenti sono maggiormente preparati dagli appunti di Xh.Gj)



## Argomenti aggiuntivi

## TLR

I TLR o **Toll-Like receptors** sono una famiglia di **PRR** (Pattern Recognition Receptors) espresso da molti tipi cellulari in grado di riconoscere i prodotti di una grande varietà di microbi o di molecole espresse o rilasciate da cellule danneggiate.

- Nell'uomo esistono **10 TLR** (TLR1-TLR10)
- Sono glicoproteine di membrana con ripetizioni di **residui di leucina** (regione extracellulare), fiancheggiati da motivi di **cisteina** responsabili del riconoscimento del ligando.
- Le loro code citoplasmatiche contengono un **dominio di omologia = TIR** (Toll-IL 1 Receptor).
- Il dominio TIR si ritrova anche nelle code citoplasmatiche dei recettori per IL-1 e IL-8, 2 citochine che attivano una cascata di trasduzione simile a quella di TLR.
- Sono coinvolti anche nella risposta a molecole endogene la cui espressione indica la presenza di un danno cellulare.
- Molecole self intracellulari di cellule danneggiate o morte che legano i **TLR2 e 4**:
  - **HSP** (Heat-Shock Protein): in risposta di segnali di shock o stress cell.
  - **HMGB-1**: proteina che lega il DNA coinvolta nella trascrizione e riparazione del genoma.
- La specificità dei TLR è influenzata da molecole accessorie. **Esempio:**  
**TLR-4** lega **LPS** mediante proteine solubili presente nel sangue o fluidi ex.cell.:
  - **LBP** (LPS Binding Protein): facilita il trasporto alla superficie della cellula in grado di riconoscere il LPS
  - **MD2** (Myeloid Differentiation Protein 2): lega il LPS a livello del lipide A, formando un complesso che poi interagisce con il TLR4.
  - **CD14** (espressa su tutte le cellule tranne endotelio) necessaria affinché l'attivazione del fagocita sia efficiente.  
Combinazioni diverse di molecole accessorie permettono di ampliare la gamma delle molecole in grado di attivare l'immunità innata.
- La risposta ai proteoglicani avviene dai dimeri TLR-2 e TLR4; i TLR possono formare **omodimeri** o **eterodimeri**.
- I TLR sono localizzati in diversi compartimenti cellulari in modo da poter riconoscere microbi in cicli di crescita differenti.
  - **TLR 1,2,4,5,6** sono espressi a livello della membrana cellulare e riconoscono i **PAMP** nell'ambiente extracellulare.  
I PAMP sono profili molecolari associati a patogeni:
    - Acidi nucleici (RNA-duplex o DNA ricche di motivi non metilate CG)
    - Proteine microbiche (Es.: quelli che iniziano con N-metilmetionina)
    - Lipidi: LPS o l'acido teicoico
    - Oligosaccaridi come residui di mannosio

- **TLR 3,7,8,9** sono **intracellulari** espressi nel R.E o nelle membrane endosomiali. Necessitano una proteina di R.E UNC-93B  
TLR3 lega RNA-duplex; TLR7 e 8 riconoscono RNA a singola elica  
TLR9 riconosce DNA a singola o doppio elica non metilata.

### Trasduzione del segnale

- Quando TLR riconoscono i propri ligandi si **dimerizzano** e innescano cascate di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di fattori trascrizionali, i quali inducono l'espressione dei geni necessari per la risp. infiammatoria o antivirale.
- TLR 1,2,5,6 utilizzano una proteina adattatrice **Myd88** che attivano i fattori trascrizionali NF-kB e AP-1.
- TLR3 utilizza il TRIF (TIR domain containing-adaptor including IFN- $\beta$ ) che attiva i fattori trascrizionali IRF3 e IRF7. (IRF - fattore di risposta dell'interferone) i quali promuovono la produzione di IFN di tipo I (**IFN-  $\alpha$  e IFN- $\beta$** ), importanti per le risposte **antivirali**.
- TLR4 attiva **entrambe** le vie precedenti
- TLR7 e TLR8 utilizzano **Myd88** all'interno del endosoma ed attivano NF-kB, IRF7

## Inflammasoma

Gli inflammasomi sono complessi enzimatici multiproteici che si formano nel citosol in risposta a infezioni o lesioni cellulari che producono caspasi-1 proteoliticamente attiva generando forme attive di **IL-1 $\beta$**  e **IL-18**.

### Struttura: Sensore + caspasi-1 + adattatore che li unisce

**I sensori:** parte della famiglia NLR (NLRB, NLRC4 e almeno 6 NLRP) e della famiglia AIM2 e IFI16 con domini di riconoscimento di DNA e un sensore pirinico (non parte di NLRP) ma partecipa nella formazione dell'inflammasoma.

### Processo


1. L'assemblaggio avviene quando i sensori citosolici riconoscono PAMP e DAMP citosolici generando inflammasomi, attivati da una varietà di stimoli citoplasmatici associati a:
  - infezioni o stress cellulare (prodotti microbici es.: DNA virale **muramyl dipeptide** e cristalli **endogeni** ed **esogeni** es.: alluminio, asbesto)
  - riduzione della concentrazione citosolica di ioni potassio.
2. **Esempio:** I NLRP3 si associano tra loro formando un oligomero ed ogni NLRP lega un adattatore ASC.
3. Il legame fa possibile il raggruppamento di altre ASC che reclutano una pro-caspasi-1  $\Rightarrow$  caspasi-1  $\Rightarrow$  taglia a livello citoplasmatico il precursore dell'IL-1 $\beta$  e il IL-18.
4. **Caspasi-1** scinde anche la **gasdermina D** che polimerizza e forma pori nella membrana attraverso i quali IL-1 $\beta$  lasciano la cellula  $\Rightarrow$  infiammazione acuta. I pori di gasdermina D causano piroptosi (apoptosi per afflusso di H<sub>2</sub>O).



## Macrofagi

I macrofagi sono cellule dell'immunità innata con  $d=25-50\ \mu m$  con ruolo sia nell'immunità innata (risposta infiammatoria) che adattativa (agiscono da APC)  
Sono cellule che derivano dai **monociti circolanti**. Markers identificativi: **CD14** e **CD68**.

### Funzioni

1. **Fagocitosi** di **patogeni extracellulari** mediante enzimi e produzione di radicali liberi di  $O_2$  e azoto nei fagolisosomi durante l'infiammazione acuta.  
3 molecole microbicidi:
  - ❖ **Specie reattive dell'ossigeno** (ROS) generata da NADPH ossidasi - riduce l'ossigeno molecolare in ROS tramite la NADPH. I ROS. **es**: radicali di superossido viene enzimaticamente dismutato in  $H_2O_2$  usato dalla **mieloperossidasi** a creare acidi ipoclorogenati tossici (HOCl) che danneggiano i patogeni; più presente nei neutrofili che macrofagi però. Il processo tramite cui vengono generati ROS = burst respiratorio  - richiede un alto consumo di ossigeno.
  - ❖ **Monossido d'azoto** (NO) più presente nei macrofagi - produce specie reattive di azoto come NO tramite l'enzima iNOS - catalizza la conversione di arginina e citrullina con rilascio di NO.  $NO + H_2O_2$  è molto tossico per i patogeni.
  - ❖ **Enzimi proteolitici** **es**: elastasi, catepsina G presenti nei fagolisosomi.
2. **Eliminazione di cellule morte** o danneggiate e anche neutrofili esausti nel tessuto infiammato.
3. **Eliminazione delle cellule apoptotiche** prima che liberino sostanze dannose

Questa "pulizia" si realizza in caso di:

- Danno sterile del tessuto
- Infezione
- Rinnovo fisiologico, angiogenesi e sviluppo (secretono fattori di crescita, TGF- $\beta$ )

### Altre funzioni

- Produzione di citochine che modulano l'attivazione e il reclutamento di leucociti
- Sono APC, capaci di presentare Ag ai linfociti T
- Processo riparativo (angiogenesi e fibrosi)

L'**attivazione** avviene tramite il riconoscimento di strutture microbiche o molecole prodotte dall'ospite in caso di infezione (PAMP) o danno sterile (DAMP)

Può attivarsi in modalità diverse in base alle citochine presenti nel microambiente  
Meccanismi di attivazione di immunità innata:

- **PRR** (TLR), i recettori per le opsonine (Fc e C3b) e complemento, i recettori per le citochine IFN- $\gamma$  prodotta dai NK e ILC-1

Meccanismi di attivazione di immunità adattativa:

- **Attivazione classica:** attivazione fagocitica potenziata dai T CD4<sup>+</sup> (esprimono CD40L per il CD40 dei macrofagi) e dai recettori per **IFN-γ** prodotte dai TH1, T CD8<sup>+</sup>
- **Attivazione alternativa:** attività di rimodellamento e riparo del tessuto

Molti tessuti presentano macrofagi residenti che derivano dai precursori a livello del sacco vitellino e del fegato durante lo sviluppo embrionale con fenotipo specifico a seconda del tessuto. **Es.:** cellule di Kupffer, osteoclasti, c.di Langerhans, c.di microglia (Tutti i tre argomenti sono maggiormente preparati dalle slides #2 e #3.)

## Polarizzazione TH1, TH2 e TH17

I linfociti TH1, TH2 e TH17 si sviluppano tutti da linfociti T CD4<sup>+</sup> naive dovuta:

- dalle citochine prodotte dalle APC (DC e macrofagi) anche ILC e mastociti che promuovono o inibiscono lo sviluppo di una popolazione, in base dei fattori trascrizionali che attivano.
- Affinità del TCR, quantità del Atg, natura del APC e caratteristiche genetiche

### TH1

Produce **IFN-γ**. Il differenziamento è dovuto dalle cellule effettrici di tipo TH1 stimolato dai batteri intracellulari, virus ed alcuni parassiti che infettano le DC e macrofagi, infezione che stimolano la produzione di IL-12, IL-18 e IFN di tipo 1.

Le NK producono IFN-γ che agisce su DC e macrofagi a produrre IL-12. Entrambi le citochine attivano i fattori trascrizionali T-BET, STAT1, STAT4 - TH1.

L'IFN-γ attiva STAT1 - attiva il T-Bet - attiva il gene dell'IFN-γ o fa rimodellamento cromatinico del promotore del gene. IL-12 stimola il STAT4 che aumenta i lvi di IFN-γ

### Funzioni

Produrre **IFN-γ**:

- ❖ la principale citochina responsabile dell'attivazione microbica dei macrofagi (l'attivazione classica)
- ❖ Attiva i macrofagi e DC anche di produrre citochine e chemochine infiammatorie TH1 esprimono CXCR3 e CCR5, che legano le rispettive chemochine che vengono prodotte durante le risposte innate → sono abbondanti nei focolai di infezione
- ❖ Amplifica la polarizzazione in TH1 e inibisce la polarizzazione in TH2 e TH17
- ❖ Stimola l'espressione di diverse citochine che contribuiscono ad una migliore presentazione dell'antigene ai linfociti T (proteasome e molecole B7)

## TH2

La citochina che promuove lo sviluppo è il **IL-4** prodotta dalle cellule **TH2** stesse, prodotta anche da **ILC 2**, stimolati dall'antigene e dai mastociti.

Altre citochine che promuovono lo sviluppo: **IL-25**, **IL-33**, linfopoietina stromale timica **TSLP**.

IL-4 attiva il fattore di trascrizione **STAT6**, in associazione ai segnali di TCR, induce l'espressione di **GATA-3**, fattore di trascrizione che stimola l'espressione di citochine di TH2: **IL-4**, **IL-5**, **IL-13** e anche blocca l'espressione della catena responsabile dell'espressione di IL-12.

Il recettore di IL-4, trasduce il segnale attraverso la via JAK-STAT.

### Funzioni

- IL-4 e IL-13 prodotta da TH2 promuove lo scambio isotipico verso IgE: i principali mediatori dell'ipersensibilità immediata (allergie)
- **Solo l'IL-4** induce la polarizzazione dei T CD4+ naive verso TH2 effettori
- IL-4 e IL-13 contribuiscono a una forma **alternativa** di attivazione dei macrofagi, di riparazione (es.: fibrosi e di angiogenesi) inibendo quella classica di fagocitosi.
- IL-4 e IL-13 stimolano la peristalsi gastrointestinale e produzione del muco
- IL-4 e IL-13 fanno esprimere molecole di adesione che reclutano gli eosinofili
- IL-5 stimola la proliferazione ed attivazione degli eosinofili.  
IgE legano gli elminti e possono attivare i mastociti e gli eosinofili: secrete le proteine cationiche e basiche maggiori che danneggiano gli elminti.

## TH17

Polarizzazione che **avviene** in seguito dalla produzione di **IL-1**, **IL-6** e **IL-23** dai DC e macrofagi in risposta ai batteri e funghi. **TGF- $\beta$**  contribuisce nella polarizzazione.

Lo sviluppo dei linfociti TH17 dipende dai fattori trascrizionali **ROR $\gamma$ t** e **STAT3**.

TGF- $\beta$ , l'IL-6 e l'IL-1 contribuiscono sull'espressione di ROR $\gamma$ t.

Sono abbondanti nella mucosa gastrointestinale.

### Funzioni

- **Produce IL-17**: reclutamento dei **neutrofili** i quali fanno **fagocitosi e uccisione nei fagolisosomi** dei batteri e funghi che sopravvivono all'esterno delle cellule. IL-17 promuove la produzione IL-18, TNF, G-CSF: reclutamento dei neutrofili i quali causano infiammazione; IL-17 promuove anche la produzione di defensine.  
**Produce IL-22**: mantenimento dell'integrità delle barriere epiteliali, promuovendo le funzioni della barriera meccanica, riparazione e produzione di peptidi antimicrobici ma possono anche promuovere l'infiammazione  
**Produce IL-21**: ruolo nella risposta anticorpale nei centri germinativi; ruolo autocrino di amplificazione dei funzioni di TH17.

(L'argomento è maggiormente preparato dagli appunti di I.C.)

## MALT

MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue o Tessuto linfoide associato alle mucose comprende il sistema immunitario associato alle **mucose gastrointestinale (GALT)**, **broncopolmonare (BALT e NALT)** e **genito-urinario** oltre al **sistema cutaneo**.

### Caratteristiche

- ❖ Tutti condividono un'organizzazione **anatomica** di base, 1 strato di epitelio esterno, 1 strato di connettivo sottostante e infine gli organi linfoidei 2° locali.
- ❖ Ciascun sistema immunitario contiene **tipi cellulari unici** che conferiscono specifiche funzioni.
- ❖ La migrazione e la localizzazione di classi di linfociti in specifici tessuti sono dovute a **meccanismi di homing specifici** del tessuto.
- ❖ I sistemi immunitari hanno anche **funzioni di regolazione** che prevengono reazioni indesiderate. **Es.**: Inibizione delle risposte contro batteri commensali.

### GALT - Gut Associated Lymphoid Tissue

#### Anatomia

**Barriera epiteliale**: singolo strato (mucosa) e più strati (cute); solo meccanismi **innati**

Il **tessuto connettivo lasso** o **lamina propria** si trova al di sotto e contiene vasi sanguigni, linfatici e MALT responsabili di risposte **innate e adattative**.

I **linfonodi drenanti** localizzati fuori del "tessuto barriera" amplificano la risposta **adattativa**.

#### Immunità innata

Le cellule epiteliali prevengono l'invasione microbica tramite i **tight junction**, dal rapporto occludina-claudina). Esistono cellule epiteliali presenti nelle cripte delle ghiandole intestinali:

- Cellule **caliciformi**: secernenti muco nella parte più alta dei villi. La mucina e il glicocalice creano uno strato viscoso che impedisce ai batteri di entrare in contatto con l'epitelio.
- Cellule **M**: specializzati nella cattura dell'antigene; rivestono i tessuti linfoidei
- Cellule di **Paneth**: localizzate nel fondo delle cripte; secernono peptidi antimicrobici, le defensine i quali danneggiano l'integrità delle membrane dei microrganismi.

I **TLR** e i recettori di tipo NOD espressi dalle cellule epiteliali intestinali, promuovono la **risposta infiammatoria**. TLR5 - riconosce la flagellina batterica. TLR4 espressi dai DC e macrofagi della lamina propria riconoscono il LPS.

Le **ILC3** (molto presenti qua) rispondono alle **allarmine IL-1  $\beta$**  e secernono e secernono IL-17 - infiammazione. L'azione delle ILC-3 è regolata dal SNA (neuromedina U)

**Cellule col ciuffo** (Tuft Cell) si attivano dagli elminti e secernono IL-25, stimola ILC-2 a secernere IL-13 - attiva le cellule caliciformi di produrre muco.

I linfociti T invariati associati alle mucose (**MAIT**) rispondono ai **metaboliti** della **vitamina B** generati dai batteri.

### **Immunità adattativa**

**Umorele:** rappresentata dalle **IgA**, molto prevalenti dall'abbondanza di **TGF- $\beta$**  prodotte dalle cellule epiteliali e vitamina A che favorisce lo scambio isotipico verso IgA.

Le IgA e IgM vengono secrete nel lume tramite transitosi grazie ai recettori poli-Ig espresse dalle cellule epiteliali e neutralizzano i microbi. Le IgG monomeriche legano il recettore FcRn.

**Cellulo-mediata:** rappresentate dai **T intraepiteliali** con limitato spettro di specificità e sono per lo più **CD8+**, **T CD4+ effettori** e di **memoria** nella lamina propria, **T naive**. Le risposte avvengono in strutture organizzate, principalmente le **placche di Peyer**, che si trovano più nell'ileo distale, e da piccoli aggregati di **follicoli linfoidi** nell'appendice e colon. Le placche di Peyer sono simili ai follicoli linfoidi con **centri germinativi** contenenti **linfociti B**, **Th follicolari**, FDC e macrofagi, ma **non capsulate**. Tra i follicoli sono le aree parafollicolari piene di linfociti T. **Processo:**

1. Gli Agt non arrivano per via linfatica ma dalle cellule M che si trovano nell'epitelio. Non sono APC perché non processano il materiale inglobato e sono in grado di attivare i linfociti B nativi.
2. Gli APC sono le DC della lamina propria che catturano questi antigeni e attivano i T CD4+ naive. I T attivati migrano insieme agli APC nei linfonodi drenanti e lì continua l'attivazione. I T effettori si differenziano in **TH17**, secerne **IL-17**, in **TH2** secernenti **IL4/13** in caso di infestazione di elminti e in **Treg FoxP3+**.

I B effettori si differenziano in plasmacellule secernenti **IgA**.

T effettori e regolatori i quali fanno homing nella lamina propria esprimendo l'integrina  **$\alpha 4\beta 7$**  e **CCR9** che legano **MadCAM-1** e **CCL25** nella lamina propria dell'intestino.

Il homing nel colon richiede l'espressione di **CCR10** che lega **CCL28**.

I Treg FoxP3+ TGF $\beta$ , IL-10 e IL-2 sono importanti per mantenere l'omeostasi e inibire l'infiammazione.

Molte delle caratteristiche già descritte per l'immunità GI sono condivise dell'immunità mucosale presente in altri distretti.

(L'argomento è maggiormente preparato dagli appunti di Xh.Gj e I.C)

## Antigeni tumorali

I più importanti antigeni tumorali sono quelli proteici e possono essere classificati in:

### 1. Neoantigeni

Proteine codificate dai **geni mutati**, che appaiono estranei al sistema immunitario perché non esistono in cellule normali; di solito codificati da geni che portano:

- a. mutazioni **casuali** o **passenger**: mutazioni puntiformi o delezioni non collegate allo sviluppo o al fenotipo maligno del tumore.
- b. mutazioni **pilota** o **driver**: mutazioni negli oncogeni o geni soppressori tumorali che sono collegati allo sviluppo del tumore.

I neoantigeni possono essere riconosciuti solo se i peptidi presentati da MHC possono essere riconosciuti dai linfociti T.

### 2. Antigeni oncofetal

Proteine espresse ad elevati livelli dalle cellule neoplastiche dei tessuti fetali durante lo sviluppo ma **non** dai tessuti adulti. Sono espressi ad alti livelli nell'adulto in caso di infiammazione e non sono limitati ai tumori.

### 3. Proteine cellulari espressi in modo anormale

Prodotto dei geni che in condizioni normali sono silenziati.

**Proteine self** espressi in modo anormale nelle cellule trasformate, in grado di stimolare una risposta immunitaria.

Normalmente questi Atg sono prodotti per un periodo limitato, in tessuti non accessibili al SI e per **es.** nella vita embrionale.

La risposta per un periodo prolungato, in tessuti accessibili al SI e nella vita postembrionale può scatenare una risposta immunitaria.

### 4. Antigeni costituiti da glicolipidi o proteine alterati

I tumori umani esprimono livelli alti di glicoproteine e glicolipidi di membrana, quali i gangliosidi, antigeni del gruppo sanguigno e mucine.

**Es.**: I tumori spesso non sono in grado di regolare propriamente l'espressione degli enzimi che sintetizzano i carboidrati delle catene laterali delle mucine.

### 5. Antigeni prodotti da virus oncogeni

I prodotti di virus oncogeni si comportano da antigeni tumorali e stimolano risposte T-specifiche contro di loro.

Di solito il tumore si causa quando il DNA virale si integra nel DNA dell'ospite.

Gli antigeni possono essere rintracciabili nel nucleo, citoplasma o membrana plasmatica. Vengono processati e presentati nella superficie delle cellule tumorali dai MHC-I.

**Oncogeni diretti**: EBV - linfoma B; HPV: carcinomi della cervice uterina

**Oncogeni indiretti**: HBV e HCV: promuovono l'**infiammazione cronica** dove si ha generazione di fattori di crescita e altri stimoli che promuovono il tumore.

L'incidenza dei tumori si aumenta in caso di immunodeficienza cellulo-mediata.

(L'argomento è maggiormente preparato dagli appunti di I.C.)

## Agammaglobulinemia di Bruton

**Agammaglobulinemia X-linked o di Bruton** è una malattia recessiva causata da mutazione del gene che codifica per il Btk (Tirosina chinasi di Bruton) che comporta un arresto nella differenziazione dei linfociti B nel midollo osseo allo stadio pre-B, imputa come un fattore di sopravvivenza dei linfociti B in questo stadio.

Le donne saranno portatrici sane, quindi avremo dei linfociti B che non maturano e invece B che maturano regolarmente, ma passano l'allele mutato al 50% dei figli maschi. Ha un incidenza 1/100,000.

### Quadro clinico

La malattia è caratterizzata dalla **completa assenza** nel siero di **Ig**.

**Non** vediamo **centri germinativi**, l'**assenza di plasmacellule e Ig molto basse** o addirittura non misurabili. Talvolta è accompagnata anche da un'**insufficienza di linfociti T** probabilmente per il mancato coopero tra questi e le cellule B nella presentazione dell'antigene.

### Terapia

Per questo tipo di malattia si possono fare delle **infusioni settimanali di anticorpi** o **immunizzazione passiva**.

Descritta anche una forma autosomica recessiva con difetti nella trasduzione del segnale generato dal **pre-BCR** dovuto da mutazioni a carico della **catena pesante  $\mu$  di IgM**, **catena leggera  $\lambda$ 5** dell'**Ig $\alpha$** , subunità **p85 $\alpha$**  del **PI3 chinasi** e della proteina **BLNK**.

## Sindrome di Iper-IgM

La sindrome iper-IgM è un **deficit di attivazione dei linfociti B** dovuto ai linfociti T.

### Tipo 1

**Legata al cromosoma X**, causata da **mutazioni** nel gene che codifica **CD40L** espressa dai linfociti T, il quale non può legare il recettore CD40 nei linfociti B e non riuscire a promuovere lo switch isotipico verso IgG e IgA con un conseguente **aumento compensatorio** di IgM.

Si è aumentata suscettibilità alle infezioni di *Pneumocystis carinii/jiroveci*.

### Tipo 2/4

**Autosomica recessiva** con mutazione a carico del gene AID, che codifica per l'enzima AID coinvolta nell'ipermutazione somatica e maturazione di affinità. Si ha deficit anticorpale.

### Tipo 3

**Legata al cromosoma X**, causata da mutazioni a carico del gene **CD40** e **NEMO**, con deficit nell'attivazione dei macrofagi, linfociti B, DC e scambio isotipico. Il gene NEMO codifica per un inibitore della chinasi gamma di kB ed è necessario nella trasduzione del



segnale da CD40. Il disordine si chiama EDA-ID (Ectodermal dysplasia anhidrotic with Immune Deficiency) perché si hanno anche difetti ectodermici.

Inoltre, è aumentata la suscettibilità all'infezione di *Cryptosporidium parvum* e batteri intracellulari capsulati (micobatteri).

#### Tipo 5

**Autosomica recessiva** con mutazione a carico del gene **UNG** enzima che genera siti abasici, processo fondamentale nello scambio isotipico. Si ha deficit anticorpale.

### Sindrome di DiGeorge

È una immunodeficienza combinata grave (SCID) con incidenza 1:4000/5000.

Caratterizzata da:

- Malformazione congenita che consiste nel difettoso sviluppo del **timo**, della **paratiroidi** e di altre strutture che derivano dalla 3° e 4° tasca branchiale della vita fetale.
- Irregolare sviluppo dei grossi vasi, deformità facciale, contrazioni spastiche dei muscoli striati (tetania) dovuta ad un alterato metabolismo di calcio causato dalla malformazione dei paratiroidi.
- L'ipoplasia del timo porta una carente maturazione dei linfociti T con aumento della suscettibilità contro infezioni virali, micobatteriche e fungine.

#### Eziologia

**Microdelezione** del cromosoma **22** (22q11.2) dei 30 geni, il più importante **T-box-1** (TBX1) che causa il deficit dello sviluppo timico, espresse particolarmente durante la vita embrionale.

**Trucco mnemonico: CATCH-22** = C - difetti cardiaci, A - Anomalie facciali T - ipoplasia del timo, C - cleft palate o palatoschisi e H - ipocalcemia.

### Sindrome di Giobbe

Sindrome di Giobbe o la **sindrome di iper IgE** (superiori a 2500 IU/ml) è una **malattia ereditaria autosomica**:

1. **Dominante**: causata da **mutazioni** del gene che codifica per **STAT3** con conseguente difetto nella produzione di citochine IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 e nello sviluppo di **TH17** con ruolo di indurre l'infiammazione mediata dai neutrofili contro batteri (*S.aureus*) e funghi (candidiasi mucocutanee croniche)
2. **Recessiva**: causata da mutazione del gene DOCK8, codificante per un scambio nucleotidico con numero ridotto di linfociti T,B e NK, difetti di trasduzione e di riarrangiamento del citoscheletro, della polimerizzazione dell'actina dal complesso **ARP 2/3** richiesto nel mantenimento della fosforilazione dell'**actina**.



### Quadro clinico

Dermatite cronica pruriginosa ed aumentata sensibilità alle **infezioni** recidivanti **cutanee** e **polmonari** superficiali e profonde causata da batteri e funghi con presenza di ascessi cutanei multipli: ricordano la biblica punizione inferta a Giobbe (Job o Ayyūb).

## Sindrome di Kostmann

La sindrome di Kostmann o la neutropenia congenita grave è una malattia ereditaria, dominante o recessiva dovuta a:

1. **Mutazione di ELA2**: il gene che codifica per l'elastasi, enzima coinvolta nella digestione del patogeno, permettendo il neutrofilo di inglobare ma non digerire. Porta apoptosi dei mielociti e blocco del passaggio promielocita - mielocita.
  2. **Mutazione della proteina HAX1**: la deficienza di tale proteina mitocondriale porta ad un aumento dell'apoptosi delle cellule mieloidi in sviluppo - neutropenia.
  3. **Defetti genetici del metabolismo del glucosio**: aumento dell'apoptosi.
- In tutti i casi si ha suscettibilità a gravi infezioni batteriche.

## Deficit di MHC-I

Malattia dovuta a **mutazione** dei geni **TAP-1** e **TAP-2**, responsabili del traffico dei peptidi dal citosol al RE. Si ha un bassissimo livello di MHC-I e come conseguenza riduzione del numero e funzione di linfociti T CD8+.

Aumentata suscettibilità di infezioni batteriche ricorrenti ma non delle infezioni virali respiratorie (controsenso considerando che T CD8+ hanno risposta antivirale)

## Deficit di MHC 2

Sindrome del **linfocita nudo** è una malattia rara autosomica recessiva con ridotta o assente dell'espressione delle molecole di classe II sulle APC in risposta all'IFN- $\gamma$ . La maggior parte è dovuta da mutazioni al fattore trascrizionale C2TA o RFX5.

### Quadro clinico

Gli individui affetti mostrano **deficit delle risposte DTH** e della produzione di anticorpi diretti contro antigeni proteici T-dipendenti.

Esordio fatale entro il 1° anno di vita a meno che non si intervenga con **trapianto** di cellule staminali **ematopoietiche**.

## Sindrome di Wiskott-Aldrich

Malattia ereditaria **legata al cromosoma X** caratterizzata da **eczema**, **trombocitopenia** e aumentata suscettibilità alle **infezioni batteriche**.

## Quadro clinico

**Infezioni ricorrenti**, con riduzione del numero e della forma delle piastrine e **alterazioni nella coagulazione** (emorragie e petecchie)

## Diagnosi

- **Storia clinica**: le **infezioni** ricorrenti delle **vie respiratorie** con comparsa di questi puntini, le **petecchie** che sono il primo campanello d'allarme.
- Conferma della diagnosi: **esami di laboratorio** e l'**esame genetico**, visto che è causata da un difetto al **gene WASP** sul **cromosoma X**, sintomatico nel 50% dei maschi che ereditano l'allele mutato e asintomatico per le donne.

## AIDS

**La sindrome dell'Immuno-Deficienza Acquisita o AIDS** è una malattia infettiva e lo **stadio clinico terminale** dell'infezione provocata dal virus HIV, che attacca il sistema immunitario, rendendo più suscettibili alle infezioni e all'insorgenza di alcuni tumori.

## Patogenesi del AIDS

La malattia ha un decorso di **8-10 anni**, più lungo in caso di HIV-2, influenzata da fattori quali **immunocompromissione**, **inoculo** ripetuto o massivo di HIV, **attivazione** linfocitaria. Sono distinti 4 fasi:

### 1° fase: fase latente

- a. Il virus entra tramite sangue, organi genitali, retto, cute dalle punture, mucose dalle contaminazioni, organi dai trapianti.
- b. Dura da 4-6 settimane a 6 mesi, asintomatica caratterizzata da un'abbondante replicazione virale.
- c. Il virus si localizza a livello dei **linfociti T di memoria** delle mucose dove penetra.
- d. La popolazione virale precoce ha un tropismo maggiore per i macrofagi e quella tardiva ha un tropismo maggiore per i linfociti T CD4+.
- e. La produzione anticorpale è assente per cui i soggetti sono **sieronegativi** anche se infetti. Il periodo di sieronegatività si chiama anche **periodo finestra**.

### 2° fase: fase acuta o infezione primaria

- a. Sintomi aspecifici, simil-mononucleosi
- b. **Carica virale elevatissima**, generalmente da  $10^3$ - $10^5$  copie di RNA/ml.
- c. Attivazione dell'**immunità umorale** con comparsa di anticorpi anti-HIV e si ha **sieropositività**.
- d. Abbondante deplezione di CD4+
- e. Risoluzione entro poche settimane dall'attività dell'immunità, ancora competente.

### 3° fase: fase cronica, di latenza cronica o periodo asintomatico

- a. Caratterizzata da assenza di segni clinici
- b. Dura da **pochi mesi** fino a **15 anni**.
- c. **Carica virale**: 10,000 - 100,000 copie di RNA/ml

- d. La replicazione virale è continua ed abbondante con produzione di circa **10 miliardi** di particelle virali prodotte ed eliminate ogni giorno; **300-500** per cellula.
- e. **Deplezione di linfociti T**: Ogni giorno vengono uccisi **un miliardo** di linfociti T. Comunque vengono prodotti e maturati altri linfociti T combattendo efficacemente l'infezione, senza sintomi e segni clinici.
- f. Entro un periodo di 2-6 mesi la concentrazione del virus plasmatico e di linfociti T CD4+ plasmatici stabilizzano un **setpoint**, variabile in base al soggetto, i quali sono importanti indicatori prognostici.

#### 4° fase: fase sintomatica o AIDS

- a. Carica virale di nuovo elevata con più di 100,000 copie di RNA per ml di sangue con 50% di virus costituite da varianti virali genetiche quasi-specie.
- b. Quando i linfociti CD4+ scendono al di sotto di **300/ml** di sangue compaiono i **primi sintomi** dovute alle infezioni di *C.albicans*, deperimento organico, alterazioni neurologiche.
- c. Quando i linfociti CD4+ scendono al di sotto di **200/ml** di sangue si manifesta l'**AIDS conclamato**/ evidente grazie ad una nuova viremia incontrollata e con sintomi dovute alle infezioni opportunistiche di HSV, CMV, toxoplasma, micobatteri atipici.
- d. I pazienti risultano altamente suscettibili a tumori letali con linfomi, **sarcoma di Kaposi** e **AIDS-dementia complex** in 15-30% dei pazienti dovuta ad un'infezione delle microglia, in cui si ha lento deterioramento delle capacità intellettive e segni neurologici simili ai sintomi iniziali del morbo di **Alzheimer**:
  - Sintomi motori (andatura traballante)
  - Sintomi cognitive (perdita di memoria, lentezza)
  - Sintomi comportamentali (apatia)
  - Sintomi dello stadio avanzato (mutismo, paraplegia)

Questa descrizione si applica nella maggior parte di soggetti con AIDS ma alcuni pazienti rientrano nella categoria dei **long term non progressor**, per le abilità straordinarie genetiche e immunologiche.

#### Immunità dell'AIDS

- Nelle fasi precoci la risposta immunitaria contro HIV è simile alle risposte immunitarie verso altri virus ed è efficace nell'eliminare gran parte di virioni.
- La risposta immunitaria specifica è quella cellulo-mediata dei CTL i quali riescono a controllare l'infezione nella fase acuta.
- Tra le 6 e le 8 settimane compaiono gli anticorpi principalmente contro **gp120** e **gp140**, i quali non sono neutralizzanti ma possono contribuire all'ADCC (Citotossicità cellulare anticorpo dipendente) da NK e ADCP dalle cellule dendritiche.

Il virus riesce a **eludere** queste difese principalmente perché:

1. è estremamente variabile a causa dell'imprecisione della trascrittasi inversa.

2. Si verifica uno sbilanciamento delle sottopopolazioni TH1 e TH2 con prevalenza dei secondi i quali producono IL-4 che inibiscono la produzione di IgG antivirali.
3. Formano sincizi e passano da una cellula all'altra restando mascherati.

### Epidemiologia dell'AIDS

- 40 milioni di persone infette, la maggior parte nell'Africa occidentale dove è endemico dalle scimpanzé che possiedono il virus come retrovirus endogeno.
- Ogni anno si registrano 2.7 milioni di nuove infezioni.
- L'età di comparsa di malattia si sta aumentando, da 26 anni nel 1985 a 36 anni.

### Diagnosi

- **Test sierologici** verso antigeni o anticorpi.
  - ❖ Gli **anticorpi** sono rilevabili entro 6-12 settimane dell'infezione.
  - ❖ I campioni positivi richiedono un test di conferma **anti-p17/p24/p35** proteine precoci o test di conferma **anti-gp160/gp120** - proteine più tardive e persistenti.
  - ❖ Per lo **screening** di routine si ricorre al **test ELISA**, che può dare falsi-positivi i quali si devono confermare tramite **Western-blot** che ha una specificità di 100%.
- **Test genetici**; ricerca di sequenza genomiche virali nel siero o nel plasma, tramite la ricerca del gene gag e pol, tramite PCR o RT-PCR. Ha una sensibilità di 99% se sono presenti almeno 10 copie virali.
- **Test immunologico**: la valutazione dei sottoclassi di linfociti T sono altamente alterati nei soggetti HIV-positivi.

### Prevenzione

Comprendono strategie anti-HIV, come educazione sanitaria screening di sangue, controllo dei soggetti con rischio di infezione, vaccini e farmaci.

Un vaccino efficace ancora non esiste, per l'instabilità genetica di questo virus e come conseguenza di [variabilità della proteina gp120](#).

### Trattamento

**Trattamento antiretrovirale altamente attivo/HAART: inibitori delle proteasi + 2 inibitori della trascrittasi inversa** ma è improbabile che essi riescano ad eradicare completamente l'infezione.

I farmaci si somministrano quando il paziente mostra sindromi cliniche e quando i linfociti CD4+ scendono al di sotto di 200 per ml. Gli farmaci sono separati in 5 classi:

1. Inibitori della fusione-penetrazione ([Maraviroc](#), [T20](#))
2. Analoghi nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa ([azidotimidina](#))
3. Analoghi non-nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa ([delavirdina](#))
4. Inibitori della proteasi ([saquinavir](#), [atazanavir](#))
5. Inibitori dell'integrasi ([RAL](#), [EVG](#))

(Gli argomenti di immunopatologia sono maggiormente preparati dagli appunti di I.C e immunopatologia da 56 pagine, tranne l'AIDS che è totalmente copiato dai miei appunti di microbiologia.)

## Trapianti

Il trapianto è una procedura utilizzata per sostituire cellule, tessuti o organi (trapianti) con compromessa funzionalità con controparti sane.

Vengono prelevati dal soggetto donatore e trasferiti ad un soggetto di solito diverso, il ricevente o l'ospite.

- ❖ Trapianto **ortotopico**: se il trapianto è posto nella sua sede anatomica **naturale**.
- ❖ Trapianto **eterotopico**: se il trapianto è posto in un sito anatomico **diverso**.
- ❖ Trapianto **autologo** o autotrapianto: entro lo stesso individuo
- ❖ Trapianto **singenoico**: tra due individui geneticamente identici. No rigetti!
- ❖ Trapianto **allogenoico** o allotrapianto: tra due individui geneticamente diversi.  
Si riconoscono alloantigeni ed è seguito sempre da rigetto.
- ❖ Trapianto **xenogenico** o xenotrapianto; tra due specie diverse.  
Si riconoscono xenoantigeni.

### I rigetti:

Primari: si manifesta entro 10-14 giorni dal primo trapianto

Secondari:

- I trapianti **tra individui geneticamente identici** (gemelli identici) non vengono **mai rigettati**.
- I trapianti **tra individui geneticamente diversi** vengono **sempre rigettati**.
- I trapianti da genitori (A o B) al figlio (AxB) non vengono rigettati, eccetto i trapianti del midollo osseo.
- I trapianti dal figlio (AxB) ai genitori (A o B) vengono sempre rigettati.