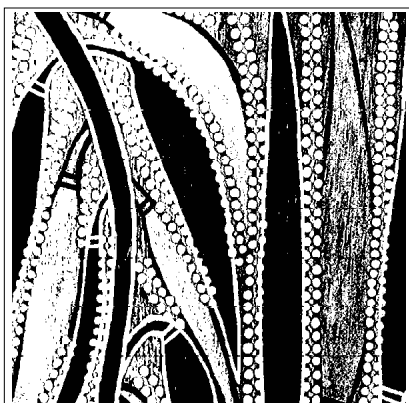


Caleidoscopio



**Marcella Arras
Licinio Contu**

Molecole di membrana e funzione immunologica

Parte Seconda: I Linfociti T e NK

Istituto di Clinica Medica
Cattedra di Genetica Medica
Università degli Studi di Cagliari

79

**Direttore Responsabile
Sergio Rassu**

 **MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1993

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Endocrinologia, di Patologia Clinica o di particolare interesse in altri campi della Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile in base alla loro esperienza e competenza. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, purché redatte secondo le regole editoriali e conformi allo spirito della Rivista.

TESTO. In considerazione del carattere didattico, la monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati, è opportuno evitare di riportare contrastanti o solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte, in rapporto anche al numero di tabelle e figure. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio. Tutte le pagine del testo devono essere scritte a spaziatura 2, con sufficienti margini e numerate consecutivamente.

TABELLE E LE FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di comparsa nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Si consiglia la realizzazione di disegni e figure con una larghezza non superiore ai 9 cm. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le illustrazioni. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione delle figure, grafici ed altro.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, l'eventuale Clinica o Istituto di lavoro, l'indirizzo compreso il numero di telefono e fax.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

- 1 Guillemin R.: Peptides in the brain. The new endocrinology of the neuron. Science 1978, 202:390.
 - 2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.
- La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati europee e statunitensi (per esempio: Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e delle figure archiviati su un dischetto da 3.5 pollici Macintosh o se MS-DOS in formato RTF per il testo e PC.TIF per le figure. E' inoltre necessario accompagnare il lavoro da copie di ogni permesso di riprodurre materiale pubblicato o di usare illustrazioni che possono far riconoscere soggetti umani.

Il dattiloscritto originale, le figure e le tabelle devono essere spedite al Direttore Responsabile. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cento copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore. Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Premessa

Il ruolo delle molecole di membrana come spie della progressiva differenziazione e maturazione funzionale delle cellule immunitarie, e come strumenti delle funzioni di queste, in una determinata fase maturativa, e della loro ulteriore evoluzione fino al raggiungimento della specializzazione immunologica finale, è provato. Mano a mano che le conoscenze su queste molecole si accrescono, l'interdipendenza tra esse e le funzioni delle cellule immuno-competenti in cui sono espresse diviene più evidente.

Ciò risulta in modo particolare quando si tratta di funzioni ben definite svolte da cellule ben individuate, e quando le molecole vengono esaminate singolarmente e nelle complesse interazioni che contraggono tra loro e con molecole presenti sulla membrana di altre cellule. Esempi chiari di ciò sono il recettore TCR e le molecole ausiliarie CD3, CD4, CD8 nelle interazioni cognitive col complesso HLA-peptide, e, in sinergia con varie molecole di adesione, nella successiva serie di eventi di attivazione e di produzione di citochine che sono alla base delle funzioni immuno-regolatorie ed effettrici dei linfociti T.

Abbiamo ritenuto perciò rispondente a criteri di razionalità e ad esigenze di chiarezza espositiva proporre una descrizione degli aspetti fondamentali dell'immunologia e dei numerosi e complessi compiti che svolgono le singole cellule nelle loro diverse fasi maturative e funzionali, a partire dalle molecole espresse sulla loro membrana.

Questa seconda parte del lavoro è dedicata ai linfociti T e NK che hanno in comune: 1) la responsabilità diretta della difesa cellulo-mediata, ristretta o condizionata dal self-HLA; 2) una larga partecipazione alle attività immuno-regolatorie volte a garantire efficaci risposte difensive, sia cellulari che umorali, nei confronti degli agenti estranei, nel contesto di una indispensabile salvaguardia del self; e 3) probabilmente l'origine evolutiva e, almeno in parte, il processo ontogenetico (Versteeg e al. 1992; Lanier e al. 1992).

I Linfociti T

I linfociti T derivano dal timo e rappresentano normalmente nel sangue periferico il 60-80% circa dei linfociti totali. Sono definiti classicamente in base alla capacità di formare rosette con emazie di pecora (rosette E) e quindi al possesso del recettore CD2, o più comunemente in base alla espressione sulla membrana del marcatore CD3.

Oggi sappiamo, che questo marcatore fa parte di un complesso clonotipico multimolecolare con il recettore specifico dei linfociti T (TCR) che più esattamente ne permette l'identificazione anche nelle fasi precoci della maturazione in cui non sono ancora espressi marcatori specifici sulla membrana, ma è riconoscibile il particolare riarrangiamento dei geni codificanti per il TCR (Allison e Lanier 1987).

Tutti i linfociti T possiedono questo recettore di riconoscimento che rappresenta lo strumento comune grazie al quale essi sono in grado di avviare con alta specificità le loro diverse funzioni: adiuvante e induttrice della funzione di altre cellule, effettrice (citotossica e soppressiva) e regolatrice.

Il tipo di funzione che essi realizzano è però affidato alla presenza sulla membrana di altri marcatori che trasducono all'interno della cellula segnali positivi o negativi dopo il contatto tra il TCR e il peptide antigenico presentato, generalmente, dalle molecole HLA. La popolazione complessiva dei linfociti T è così suddivisibile in due principali sottopopolazioni caratterizzate dalla presenza sulla membrana rispettivamente dell'antigene CD4 (linfociti T helper-inducer) che rappresentano il 40-50% circa, o dell'antigene CD8 (linfociti T suppressor-citotossici) che rappresentano circa il 20-30% dei linfociti totali. Esiste inoltre un piccolo subset di linfociti T CD4⁻ CD8⁻.

1. Differenziazione dei Linfociti T

Il processo di differenziazione che porta dalla cellula staminale al linfocita T maturo avviene in tappe successive, caratterizzate dalla progressiva acquisizione sulla membrana dei recettori TCR, delle molecole associate al TCR e via via di tutte le molecole che caratterizzano il linfocita T CD4⁺ o CD8⁺ (vedi fig.1).

La prima tappa, extratimica avviene nel fegato fetale, dove la cellula staminale perviene dal sacco vitellino nel 50° giorno di vita intrauterina e rimane fino al 150° giorno, e nel midollo osseo, dove è presente a partire dall'80° giorno di vita intrauterina (compartimento staminale).

La cellula staminale caratterizzata dalla espressione sulla membrana della molecola CD34 e dell'enzima TdT, penetra nel timo e si localizza nella zona subcapsulare grazie a un recettore che interagisce specificamente con la timotaxina, un peptide prodotto nel timo. Qui evolve in pro-timociti che esprime il CD7 sulla membrana e il CD3 in sede citoplasmatica. Il CD7 è un recettore di homing indispensabile per la colonizzazione del timo fetale da parte dei pro-timociti a 9-10 settimane.

I pro-timociti CD7⁺, con o senza CD3 citoplasmatico, a partire dalla 10-11^a settimana di vita fetale danno origine nella zona sub-capsulare ai pre-timociti ed esprimono la molecola di adesione CD2 e il CD5. La successiva maturazione intratimica avviene a livello corticale, e comporta nei timociti corticali l'espressione degli antigeni di superficie CD1, CD4, CD8 e CD38, e nei timociti midollari l'espressione sulla membrana degli antigeni CD3 e CD28 con la perdita del marker TdT.

Successivamente queste cellule vanno incontro ad una dicotomia fenotipica in CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺. Solo pochissime cellule si trovano in periferia col fenotipo CD3⁺CD4⁻CD8⁻. La maggior parte delle cellule T che emigrano dal timo sono CD7⁺, CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺, TCR⁺, MHC classe I⁺ e CD4⁺ o CD8⁺. Una piccola parte di cellule T con TCR⁻ è di fenotipo CD4⁻CD8⁻.

I pro-timociti che colonizzano il timo si localizzano inizialmente nella regione subcapsulare della corticale timica. Essi passano poi attraverso la corticale e la giunzione corticomidollare alla midollare e quindi emigrano dal timo. In questo processo di trasferimento essi incontrano in successione le cellule "nurse" nella zona esterna della corteccia, le cellule dendritiche nella zona interna della corteccia, e le cellule epiteliali nella midollare. Tutte queste cellule costituiscono un sistema continuo per la differenziazione delle cellule T. Durante questo processo più del 95% delle cellule muore e il piccolo numero che sopravvive ed emigra alla periferia è self-tollerante, grazie ad un processo di selezione che sarà meglio precisato più avanti. Le cellule T con TCR⁻ riconoscono gli antigeni estranei solo in associazione con antigeni MHC di I o di II classe, mentre le cellule T con TCR⁺ riconoscono antigeni non-self, generalmente senza restrizione HLA, con meccanismi non del tutto chiari.

I tre tipi di cellule con TCR descritti, cioè le cellule TCR⁻ doppio-negative, le cellule TCR⁺ doppio-negative e le cellule TCR⁺ che esprimono CD4 o CD8 o entrambi, derivano da precursori triplo-negativi (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) (Teh e al. 1988; Emrich 1988; Strominger 1989).

Uno schema della maturazione di queste cellule è riportato nella figura 1. Le cellule TCR $\alpha\beta$ che sono CD3 $^{+}$ sono anche CD5 $^{+}$. In una fase precoce alcune cellule esprimono l'antigene CD1, che successivamente diviene di nuovo silente in quanto le cellule TCR $\alpha\beta$ CD3 $^{+}$ non lo esprimono. La maturazione delle cellule TCR $\alpha\beta$ porta in periferia cellule CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ e CD3 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$. In questo processo le cellule CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ sono in posizione intermedia e rappresentano il substrato per una selezione positiva. Le cellule non selezionate muoiono.

Tutte le cellule TCR $\alpha\beta$ CD3 $^{+}$ se doppio-negative o CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ o CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$ esprimono il CD5. La maturazione delle cellule TCR $\alpha\beta$ necessita anche dell'acquisizione del CD28 che può essere un recettore di attivazione (Moretta e al. 1987). La trascrizione e la sintesi delle catene CD3 precede il riarrangiamento dei geni del TCR. Ma in assenza dell'eterodimero $\alpha\beta$ i prodotti CD3 non sono espressi sulla membrana cellulare.

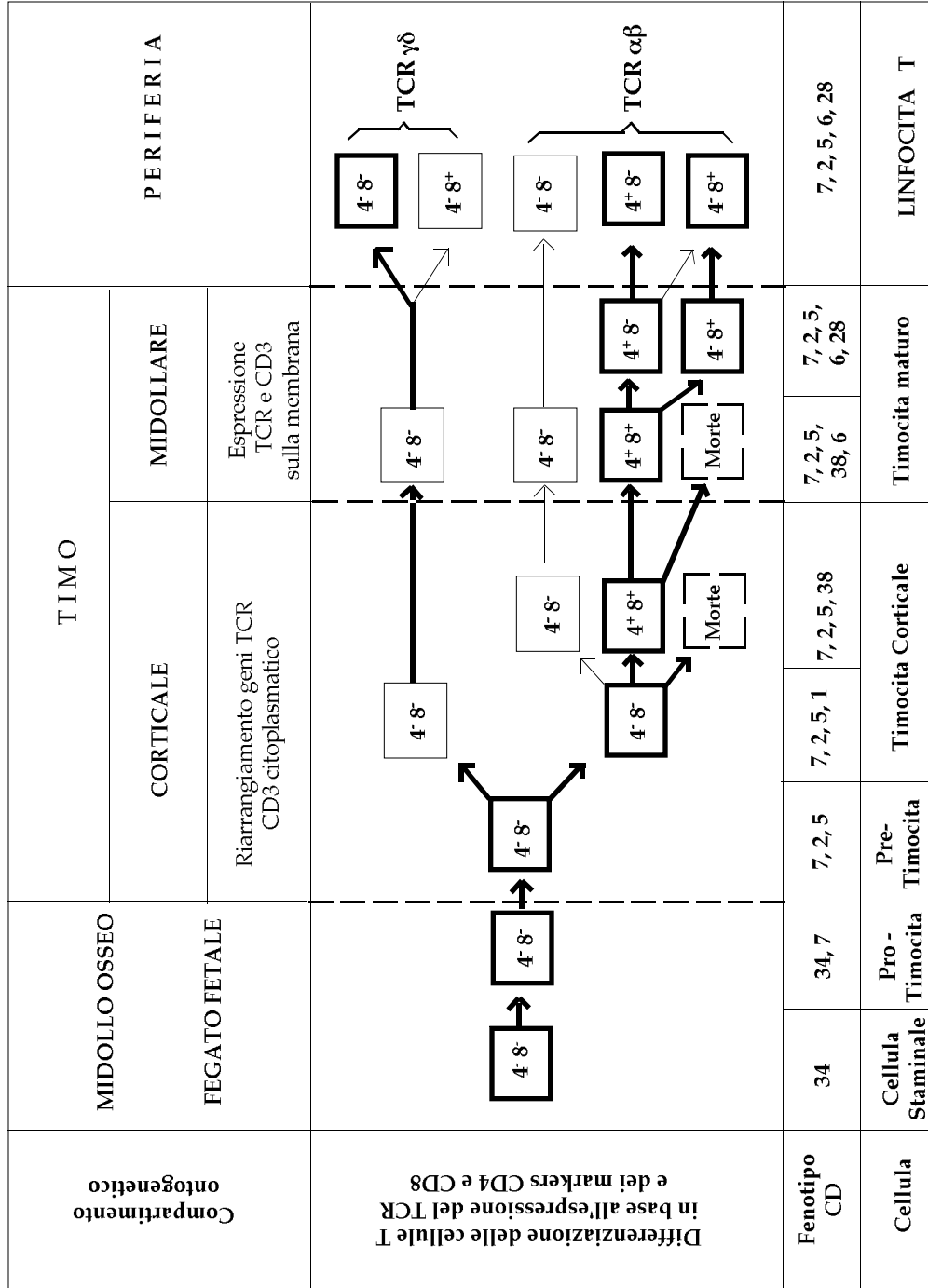


Figura 1. Schema dell'ontogenesi e della differenziazione dei linfociti T.

2. I Recettori di Riconoscimento Specifici degli Antigeni: i TCR

I linfociti T riconoscono gli antigeni estranei sulla superficie cellulare mediante recettori specifici di membrana associati al complesso monomorfo CD3. Esistono due tipi di recettori T entrambi costituiti da due catene polipeptidiche ed espressi indipendentemente su subsets T linfocitari fenotipicamente e funzionalmente diversi. Il primo tipo, scoperto nel 1984, è composto da due catene denominate α e β , e riconosce l'antigene presentato dalle molecole HLA. Il secondo tipo, identificato più recentemente, è composto da due catene denominate γ e δ , e riconosce l'antigene di solito indipendentemente dalle molecole HLA (Janeway e al. 1988). Il recettore $\gamma\delta$ portato sui linfociti T-citotossici, di fenotipo CD8, riconosce l'antigene (peptide) quando è presentato da molecole HLA di classe I (HLA-A, Cw, B) che sono espresse praticamente su tutte le cellule somatiche (esclusi i globuli rossi). Lo stesso recettore portato sui linfociti T helper-inducer (CD4), riconosce l'antigene quando è presentato da molecole HLA di classe II (HLA-DR, DQ, DP) che sono espresse sulla membrana dei linfociti B, dei macrofagi e di altre cellule APC. Le catene α e β sono associate tra loro in modo da comporre un idiotipo con caratteristiche strutturali e funzionali simili all'idiotipo delle Ig. Esse sono inoltre strettamente associate sulla membrana cellulare alla molecola CD3 che trasmette all'interno della cellula il segnale di attivazione indotto dal riconoscimento dell'antigene. La molecola CD3 funge quindi da trasduttore dell'attivazione dovuta al contatto tra recettore T e antigene. L'attivazione della cellula avviene attraverso un processo enzimatico, precisato nel capitolo 4, che porta all'espressione del recettore dell'IL-2, delle molecole HLA di classe II, delle integrine VLA-1 e VLA-2 e alla produzione di IL-2 e di altre citochine. Poichè nell'ontogenesi il riarrangiamento dei geni α e β precede quello dei geni γ e δ , il TCR $\alpha\beta$ e il TCR $\gamma\delta$ sono stati denominati rispettivamente TCR-1 e TCR-2.

2.1. Il recettore T $\alpha\beta$ (TCR-2)

La scoperta del ruolo delle molecole HLA come molecole presentatrici di antigeni (Bjorkman e al. 1987) (sotto forma di piccoli peptidi prodotti dai macrofagi e dai linfociti B per processazione di strutture poliantigeniche complesse), la descrizione precisa della conformazione e della struttura molecolare della cavità in cui i peptidi vengono accolti, e la definizione dei diversi siti di contatto tra peptidi e tasca dei peptidi, peptidi e cavità idiotipica del TCR, e tra superfici distali del TCR e della molecola HLA hanno modificato in modo sostanziale i termini della discussione sulle diverse possibili modalità del riconoscimento HLA-ristretto dell'antigene estraneo da parte del recettore TCR-2.

2.1.1. Struttura del TCR-2

Il recettore TCR-2 è presente nel 95-98% dei linfociti T maturi circolanti e nel 99% circa dei timociti, sotto forma di due catene polipeptidiche glicosilate, α e β , codificate rispettivamente nel 14° e nel 7° cromosoma, associate tra loro da un ponte disolfuro, e

da legami non covalenti con le catene ϵ e δ del recettore CD3 (v. paragrafo 3.1). La catena α ha un peso molecolare di circa 43-49 kD e la catena β di circa 38-44 kD (Reinherz 1987; Acuto e Larocca 1987; Adorini 1987; Yanagi e al. 1984). Ciascuna delle catene componenti il recettore TCR-2 è formata da due regioni, una distale che è la regione variabile (V) e l'altra prossimale che è la regione costante (C). Le regioni costanti delle catene α e β sono composte rispettivamente da 138 e 179 aa. e sono entrambe strutturate in 4 domini codificati ciascuno da 1 esone differente. Un dominio intracitoplasmatico, rispettivamente di 5 e 12 aa., è seguito da un dominio transmembrana di 20-24 aa., e quindi da due domini extracellulari mediamente di 113 aa. nella catena α e di 143 aa. nella catena β .

Il più prossimale di questi è una breve sequenza di connessione contenente una cisteina che con la cisteina controlaterale stabilisce un legame S=S tra le due catene. Il dominio costante più distale ha una conformazione ad ansa, per la presenza di due cisteine che formano un legame S=S intracatena, e una struttura terziaria simile a quella di un dominio costante delle Ig.

Le regioni variabili delle catene α e β sono composte da un dominio (amino-terminale) rispettivamente di 102 e 119 aa. Due residui cisteina formano un ponte S=S in ciascun dominio dando una conformazione ad ansa (v. fig. 2).

Le regioni V del TCR α e β hanno un alto grado di omologia con quelle delle Ig e, come queste, assicurano una estrema specificità nel riconoscimento degli antigeni estranei.

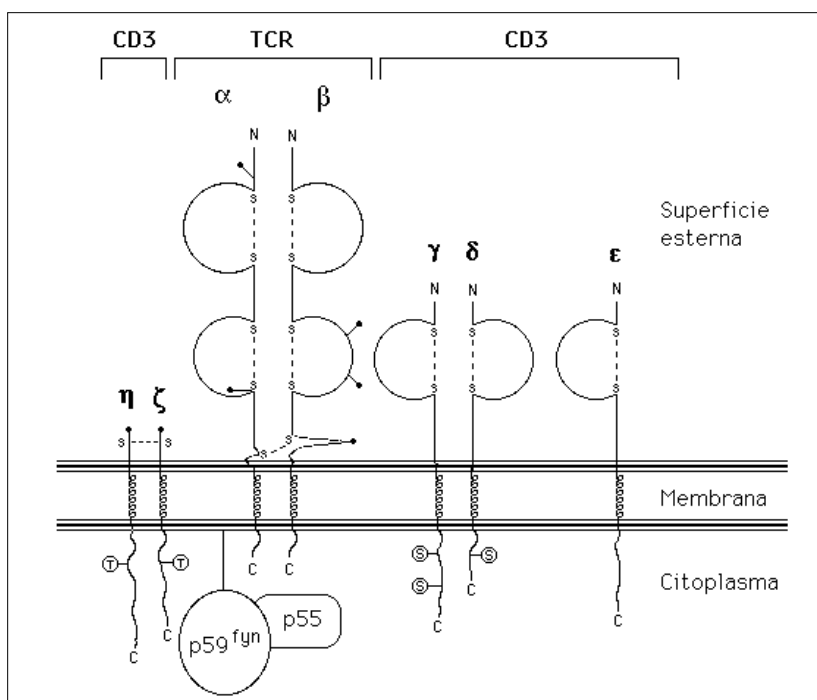


Figura 2. Struttura e organizzazione delle molecole componenti il complesso TCR/CD3 con i principali fattori di trasduzione del segnale.

2.1.2. Repertorio TCR-2

L'insieme dei recettori TCR $\alpha\beta$ costituisce in un individuo un repertorio di riconoscimento per gli antigeni altrettanto vasto di quello delle immunoglobuline (vedi paragrafo 2.3.). Esso è il risultato di un processo di riarrangiamento somatico, in parte simile a quello delle Ig, tra i segmenti genici V, D, J e C per la catena α , e V, J e C per la catena β . Ma altri fenomeni come variazioni del punto di giunzione tra segmenti, mutazioni e soprattutto inserzioni di nucleotidi random (segmenti N) tra i segmenti V, D e J sembrano più importanti della mutazione somatica nel determinare la diversità dei TCR-2.

2.2. Il recettore T $\alpha\beta$ (TCR-1)

Il recettore T $\alpha\beta$ è espresso in una piccola percentuale di linfociti T caratterizzati dalla presenza del marcatore CD3 e dall'assenza del recettore TCR-2 (0.5-5%). Per un polimorfismo della regione costante della catena α il recettore TCR-1 può avere tre forme diverse (Brenner e al. 1987). In una di esse la catena α (o α_1), di peso molecolare 36-40 kD, è associata alla catena β in modo covalente mediante un ponte disolfuro. Nelle altre due forme l'associazione della catena α (o α_2) con la catena β è realizzata da legami non covalenti e la catena α può avere un peso molecolare di 55-60 kD oppure di 35-45 kD. Viceversa la catena β sembra essere una glicoproteina costante di peso molecolare 40-45 kD. Non è chiaro il significato biologico di questo polimorfismo, ma non sembra che i tre tipi di catena α possano essere assimilati ai diversi isotipi delle immunoglobuline (Adorini 1987).

L'espressione del recettore $\alpha\beta$, come di quello $\gamma\delta$, sulla membrana cellulare è il risultato di un processo di riarrangiamento dei segmenti genici codificanti per le regioni V, J e C per la catena α e V, D, J, C per la catena β in un certo modo simile a quello ben noto per le Ig, e che assicura la specificità clonale del recettore (Allison e Lanier 1987).

I linfociti con recettore $\alpha\beta$ coesprimono sempre il marcatore CD3, ma non il marcatore CD4 e generalmente neppure il marcatore CD8. Tuttavia oltre che piccoli subsets di cellule $\alpha\beta^+CD4^-CD8^+$, è stata segnalata anche la presenza di percentuali estremamente piccole di cellule $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$ (Strominger 1989). Sono cellule dotate di attività citotossica che agiscono di norma senza restrizione HLA. E' stato suggerito che possa trattarsi di cellule NK con o senza attività ADCC, ma da un lato la presenza del complesso CD3 le distingue dalle cellule NK e dall'altro i recettori $\alpha\beta$ sono strutturalmente diversi dai recettori NK-R e Fc-R, ai quali ultimi si deve l'attività ADCC (v. linfociti NK), e dispongono di strutture idiotipiche con specificità diverse da un clone all'altro, simili a quelle dei recettori $\alpha\beta$. La sola differenza sembra essere rappresentata dalla capacità di riconoscere antigeni estranei indipendentemente dalle molecole HLA. Va tuttavia precisato che in alcune indagini è stato osservato che linee cellulari T con recettore $\alpha\beta$ coltivate in assenza di IL-2 hanno dimostrato attività sia citotossica che proliferativa, con restrizione HLA, in presenza dell'antigene estraneo attivante (Matis e al. 1987). Pertanto l'assenza di restrizione MHC nel riconoscimento dell'antigene da parte del recettore TCR-1 non è un dato assoluto, così come il riconoscimento dell'antigene da parte del recettore TCR-2 sembra poter avvenire in casi particolari in assenza di un contestuale riconoscimento del MHC. Infine, i linfociti T con recettore $\alpha\beta$ sono capaci di

produrre le stesse linfochine (IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ) dei linfociti con recettore $\alpha\beta$, suggerendo un loro possibile ruolo immuno-regolatorio (Janeway 1988). Secondo alcuni Autori queste cellule potrebbero avere la funzione di garantire una protezione precoce del feto nei confronti di virus o di altri agenti patogeni, coprendo una porzione del repertorio recettoriale non ancora coperto dal recettore $\alpha\beta$ (Adorini 1987). Ciò sembra essere suggerito sia dal fenotipo cosiddetto doppio negativo (CD4⁻CD8⁻) dei linfociti T con recettore $\alpha\beta$, fenotipo caratteristico in generale di cellule T immature, sia dal processo di ontogenesi delle cellule T CD3⁺ con recettori $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

2.3. Riarrangiamento genico ed espressione dei recettori TCR

I geni per le catene α e β sono localizzati nell'uomo nel cromosoma 7, il primo nel braccio lungo e il secondo nel braccio corto. Per le catene α essi sono organizzati in una serie di 75-100 sequenze polinucleotidiche codificanti per le regioni variabili, seguita da due serie di sequenze geniche composte da 2 esoni D, 13 esoni J e 2 geni C. Una catena α sarà prodotta da una combinazione di un segmento genico V con uno D, un segmento genico J e un gene C. Talvolta i trascritti della catena α mancano del segmento D. Uno schema dell'organizzazione dei geni codificanti per le catene dei TCR α e β e del processo di riarrangiamento somatico di essi è presentato nella fig. 3.

Saranno così possibili tante combinazioni VDJC e VJC diverse che daranno luogo a altrettante catene α differenti. Le catene β sono invece prodotte da combinazioni VJC ottenute da 8 esoni V (altri 6 pseudogeni V sono presenti nel locus β), da 5 esoni J e da 2 geni C. Gli esoni V sono distinti in due famiglie di alta omologia denominate V 1 e V 2-4. Gli esoni J sono distinti in due clusters, uno di 3 esoni e l'altro di 2 esoni ciascuno seguito da 1 gene C (Porcelli e al. 1991).

Le catene α e β sono codificate nel braccio lungo del 14 cromosoma in una regione che contiene 50-100 esoni V, 50-100 esoni J e 1 gene C per la catena β . Il locus β è localizzato tra i segmenti genici V (all'estremo 5') e J (all'estremo 3') ed è composto da 6 esoni V, da 3 esoni J, 3 esoni D e 1 gene C. Gli esoni V 1, 5, 2 sono situati in quest'ordine prima dei segmenti genici D e J; l'esone V 3 è situato in posizione 3' dopo il segmento C, mentre gli esoni V 4 e 6 non sono stati ancora localizzati con precisione (Porcelli e al. 1991). La catena α è prodotta da una combinazione V J C, e la catena β da una combinazione V D J C, o forse anche da V D J C. Tenuto anche conto delle mutazioni e delle delezioni casuali che possono verificarsi sui segmenti VD e VJ, la diversità complessiva che può essere realizzata nel locus D è molto elevata. Il riarrangiamento dei geni e la conseguente trascrizione non sono casuali, ma seguono un ordine preciso in gran parte dipendente dalla struttura stessa dei geni e dall'organizzazione di essi nei cromosomi.

Da questo dipende il fatto che la probabilità di riarrangiamenti funzionali o produttivi aumenta nell'ordine α , β , γ . Inoltre esistono tre meccanismi di esclusione che regolano la sintesi delle singole catene e degli eterodimeri:

1- un'esclusione allelica, come per i geni delle Ig, per cui un riarrangiamento dei geni codificanti per una catena su un gamete esclude qualunque riarrangiamento genico sul secondo gamete;

2- Un riarrangiamento produttivo dei geni α , β , o γ esclude qualunque altro riarrangiamento nel locus corrispondente, in una data cellula;

3- La produzione di un eterodimero completo esclude riarrangiamenti addizionali dei geni del TCR, in una data cellula (Allison e Lanier, 1987; Adorini, 1987; Janeway e al. 1988; Strominger 1989).

Alcuni recenti esperimenti condotti soprattutto con cellule di topi transgenici hanno dimostrato la possibilità di qualche eccezione a questo schema e hanno suggerito l'ipotesi di un modello di differenziazione delle cellule T e alternativo. Tale modello suggerisce che le cellule T siano commissionate verso una () o l'altra () linea cellulare prima di iniziare i riarrangiamenti (Raulet e al. 1991).

Il primo riarrangiamento dei geni del recettore sembra riguardare i geni e da luogo a una combinazione VDJC che, se funzionante, da origine ad un mRNA codificante e inibisce altri riarrangiamenti nello stesso locus. Subito dopo, o contemporaneamente, inizia il riarrangiamento dei geni e . Ma la comparsa di mRNA produttivo precede di 2-3 giorni quella di mRNA , nonostante le cinetiche del riarrangiamento di e di durante l'ontogenesi siano quasi identiche. Ciò è dovuto al fatto che per la produzione di un gene funzionale è sufficiente un singolo evento (combinazione V-J), mentre per la produzione di un gene funzionale sono necessari due eventi successivi (un primo assemblaggio D-J e un secondo assemblaggio completo V-DJ) che richiedono 2-3 giorni in più. Se il riarrangiamento è funzionale verrà inibita la seconda tappa del riarrangiamento su entrambi gli alleli e la catena prodotta potrà combinarsi con una catena dando origine all'espressione di un dimero sulla membrana. Quel linfocita produrrà solamente dimeri tutti uguali tra loro. Se viceversa il riarrangiamento non è funzionale, va avanti il riarrangiamento , la catena non trova una catena con cui associarsi, i geni vengono deleti, ed inizia il riarrangiamento dei geni VJC per la catena . Le catene prodotte si associano con catene nel dimero . Quel linfocita esprimerà solamente recettori tutti uguali tra loro.

Esiste quindi un ordine di priorità nel riarrangiamento dei geni per i TCR. Prima quello dei geni e , poi quello del gene , che viene completato solo se non si forma il dimero , e infine quello del gene , che è avviato quando quello del gene o del gene fallisce. Pertanto in un determinato timocita sarà tentata prioritariamente la produzione dei recettori e solo quando questo tentativo non ha successo saranno espressi recettori (Strominger 1989; Adorini 1987; Marrack e Kappler 1988; Allison e Lanier 1987). Questo schema ontogenetico si accorda bene anche con le seguenti osservazioni:

- 1) le cellule che esprimono eterodimeri non contengono trascritti o ;
- 2) le cellule che esprimono eterodimeri hanno sempre geni riarrangiati, ma i trascritti eventualmente presenti in queste cellule non vengono tradotti;
- 3) non c'è nessuna prova della possibile espressione di eterodimeri o .

Il risultato complessivo di questo ordinato processo di riarrangiamento genico è che le cellule discendenti da un precursore T hanno due possibilità di produrre un recettore funzionale (o) in associazione col complesso trasduttore CD3, e che un determinato clone esprimerà solamente recettori o tutti con lo stesso idiotipo (v. fig. 1).

La ragione per la quale le cellule T con recettore , che compaiono prima nell'ontogenesi, rappresentano solo una piccola minoranza delle cellule T circolanti non è chiara. E' stato già sottolineato come la probabilità di riarrangiamenti produttivi cresca nell'ordine , , , . Ma questo non spiega la rapida diminuzione delle cellule con recettore che avviene nel timo durante la vita fetale (nel topo intorno ai 170-180 giorni di gestazione). E' stato per questo ipotizzato un meccanismo di selezione negativa,

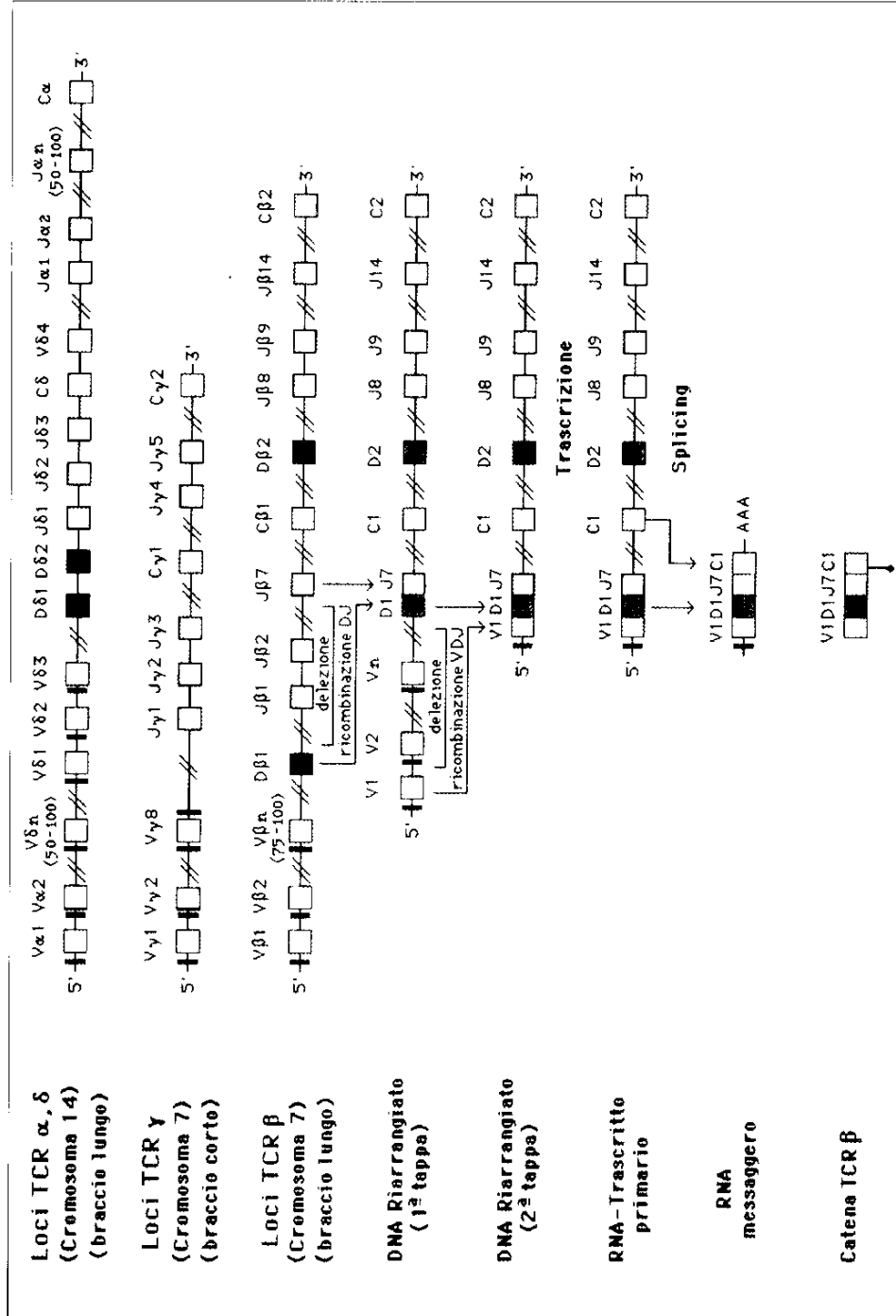


Figura 3. Organizzazione dei geni TCR α e δ nel cromosoma 14 e γ e β nel cromosoma 7. Processo del riarrangiamento somatico dei geni TCR (esemplificato per il TCR β), e sintesi della catena β .

indipendente dal riconoscimento, operata dal timo su queste cellule. Ma ciò sembra improbabile poichè la percentuale di cellule $CD3^+$ non è più alta nel topo congenitamente atimico. Sembra più logico pensare che, al contrario, i timociti con recettore $\alpha\beta$, capaci di riconoscere il self MHC, subiscano nel timo un'amplificazione e quindi una selezione positiva, mentre i timociti che non riconoscono il self MHC (una parte dei timociti $\alpha\beta$ e quasi tutti i timociti $\gamma\delta$) non vengono amplificati e tendono ad essere eliminati (v. fig. 4).

Come è schematizzato nella fig. 1, solamente i timociti che esprimono assieme al CD3 un eterodimero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ giungono vivi al termine dell'ontogenesi intratimica. Quelli che non riescono ad esprimere un eterodimero muoiono. I timociti $\alpha\beta$ sono quasi tutti $CD3^+4^-8^-$ e mantengono tale fenotipo anche in periferia dopo la maturazione. Solo alcuni di essi esprimono il marcatore CD8 a debole concentrazione; sembra che eccezionalmente queste cellule possano anche esprimere il marcatore CD4. I timociti $\gamma\delta$ sono quasi tutti di fenotipo $CD3^+4^+8^+$. Nelle ulteriori fasi differenziative in sede midollare timica e in sede post-timica vanno incontro a una dicotomia con perdita dell'espressione o del CD4 o del CD8. Del tutto recentemente sono state dimostrate sia nel topo che nell'uomo delle cellule T con TCR $\alpha\beta$ $CD4^-CD8^-$ che compaiono dopo la nascita e che non possono essere precursori di cellule con TCR $\alpha\beta$ $CD4^+$ o $CD8^+$ in quanto queste ultime sono già presenti alla nascita. Le cellule TCR $\alpha\beta$ $CD4^-CD8^-$ hanno bassi livelli di TCR $\alpha\beta$. La loro funzione non è ancora nota.

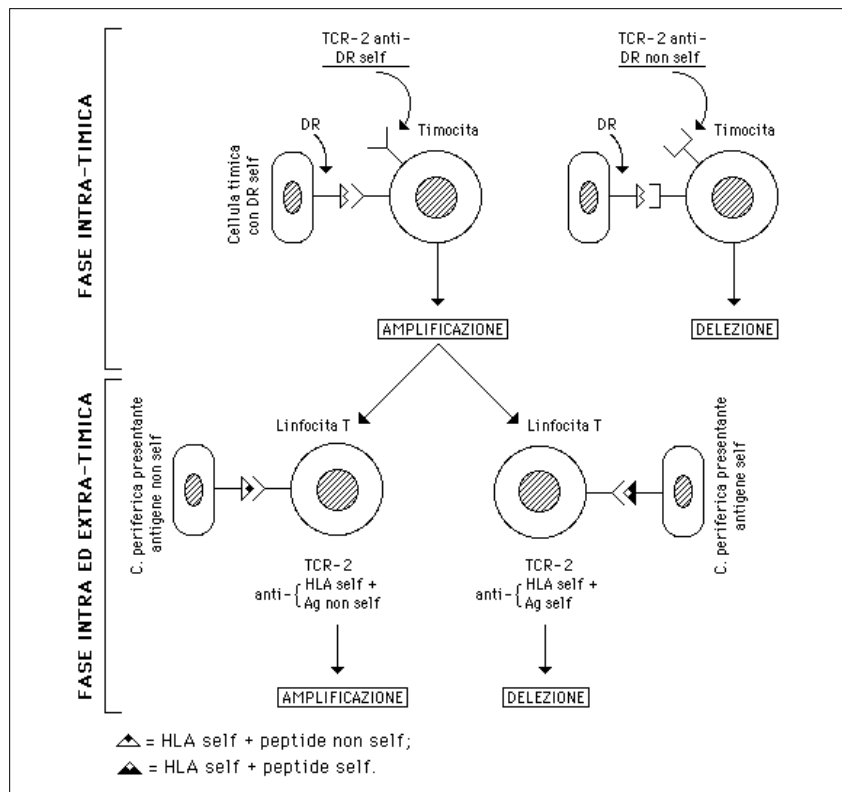


Figura 4. Schema della doppia selezione delle cellule T: positiva (intra-timica) e negativa (intra-timica e post-timica).

3. Le Strutture di Membrana Associate al TCR-2

I recettori TCR-1 e TCR-2 sono associati sulla membrana dei linfociti T con la molecola invariante CD3 in un complesso clonotipico composto dalle due catene α e β del TCR-2 o α e β del TCR-1 e dalle cinque catene polipeptidiche (δ , ϵ , ζ e η) del CD3, indispensabile per trasmettere il segnale di riconoscimento dell'antigene, e per indurre l'attivazione della cellula attraverso la trascrizione di geni per interleuchine, recettori e altre molecole. Diverse altre proteine di membrana implicate sia nel riconoscimento dell'antigene che nelle risposte funzionali sono espresse sulle cellule T. Queste sono denominate molecole accessorie dei linfociti T e comprendono gli antigeni CD4, CD8, CD2, LFA-1, CDw49, CD29, CD28, CD44, CD45R e CD5.

3.1. Il marcatore CD3

La molecola CD3, associata in modo non covalente al recettore TCR, è un complesso proteico monomorfo formato da almeno cinque catene polipeptidiche denominate δ (p.m. 25 kD), ϵ (p.m. 20 kD), ζ (20 kD), e η (due catene di 16 kD ciascuna). La catena δ è strutturata per il 90% in omodimero e per il 10% circa in eterodimero con un ponte S-S con la catena ϵ , che è la più piccola del complesso ed è associata alla catena α del TCR.

Le subunità δ e ϵ sono glicosilate, mentre ζ e η non lo sono. Tutte queste subunità sono fortemente legate tra loro da legami non covalenti. Il contatto tra il TCR e il CD3 si realizza tra la catena δ di questa molecola e la catena α del TCR, nel caso dell'eterodimero $\alpha\beta$, o la catena β , nel caso dell'eterodimero $\alpha\beta\delta$ (Janeway 1988; Reinherz 1987; Adorini 1987). La catena δ della molecola CD3 viene riconosciuta dall'anticorpo monoclonale OKT3. L'anticorpo anti-Leu4 riconosce invece la catena ϵ . Altri anticorpi monoclonali specifici per subunità CD3 sono UCHL1, BMA030 e T3. Tutti questi anticorpi possono essere adoperati per riconoscere i linfociti T in quanto l'insieme delle catene componenti le molecole CD3 è espresso su tutti i linfociti T maturi, sia con TCR-1 che con TCR-2, e su un'alta percentuale (75% circa) dei timociti. Un esempio di determinazione citofluorimetrica del fenotipo CD3 con il moAb anti-Leu 4 è dato nella figura 7.

La molecola CD3 è inoltre presente nel citoplasma di timociti subcapsulari, in una fase dell'ontogenesi delle cellule T che precede il riarrangiamento dei geni del TCR. Le unità componenti la molecola CD3 sembrano essere sintetizzate contemporaneamente, sono espresse sulla membrana solo in presenza dell'eterodimero $\alpha\beta$ o $\alpha\beta\delta$, e si associano a questo solo sulla membrana della cellula (Allison e Lanier 1987; Adorini 1987; Strominger 1989; Janeway e al. 1988). Esse hanno delle strutture primarie differenti, ma tutte possiedono un segmento intracitoplasmatico, importante per assicurare l'attivazione della cellula dopo la stimolazione antigenica sul TCR. Il segnale proveniente dal contatto antigene-TCR viene trasferito per modificazione sterica dal TCR al CD3 per mezzo dei contatti della catena δ (o ϵ) del TCR con la catena δ del CD3 e della catena β (o α) del TCR con l'eterodimero $\delta\epsilon$. La catena δ sembra essere essenziale in questo ruolo di trasduttore del segnale dell'interazione antigene-TCR che avvia la proliferazione del linfocita T. Ciò è suggerito dalla struttura di questa catena che possiede un dominio

intracitoplasmatico di ben 112 residui aminoacidici fra cui 6 o 7 siti di possibile fosforilazione delle tirosine. Le catene α e β del CD3 vengono fosforilate sul residuo serina in risposta a stimoli antigenici. Il segnale prodotto dal contatto tra l'antigene e il complesso TCR/CD3 è trasmesso alla proteino-tirosino-chinasi p59^{fyn} che attraverso interazioni con proteine G e in particolare con la p55, attiva la fosfo-lipasi-C 1. L'attivazione di una fosfodiesterasi di membrana porta all'idrolisi del fosfatidil-inositolo-difosfato (PIP2) a diacil-glicerolo ed ad inositoltrifosfato (IP3). Il diacil-glicerolo attiva la proteinochinasi C (PKC), responsabile della fosforilazione della catena α sulla serina, e la mobilitazione dei Ca^{++} intracitoplasmatici. Questi due ultimi eventi inducono attivazione della cellula e trascrizione dei geni per la IL-2 e per altre interleuchine. E' possibile che il complesso CD3 funzioni, dopo lo stimolo antigenico, come un canale ionico che favorisce la mobilitazione dei Ca^{++} attraverso la membrana. L'attivazione del linfocita T può essere causata anche dagli anticorpi monoclonali anti-CD3 prima menzionati (Feldman 1988; Male e al. 1988).

3.2. Il marcatore CD4.

Il marcatore CD4 è una glicoproteina transmembrana composta da una sola catena polipeptidica di 55 kD codificata nel 2° cromosoma. Questa molecola che caratterizza principalmente i linfociti T-inducer (i linfociti T CD4 positivi, comunemente indicati come linfociti T-helper, si suddividono in due subsets con funzioni helper-inducer e suppressor-inducer, come sarà detto più avanti) è espressa anche in altre cellule, e in particolare nei timociti maturi, nel 40% circa dei monociti, nei macrofagi, nelle cellule della glia, nelle cellule di Langerhans e, secondo alcune osservazioni, anche nel 5% circa dei linfociti B (Hansel 1987; Shaw 1987; Powrie e Mason 1988; Zambello e al. 1987).

La molecola CD4 è riconosciuta da numerosi anticorpi monoclonali tra i quali quelli di uso più comune sono OKT4, Leu3, T4 e BMA040 (Shaw 1987; Hansel 1987; Zambello e al. 1987). Attualmente c'è un notevole interesse attorno a questa molecola che è essenziale per le funzioni immunologiche dei linfociti T, ed è stata riconosciuta come il recettore del virus HIV, responsabile, come è noto, dell'AIDS. Recentemente è stato possibile produrla sinteticamente come proteina ricombinante con metodi di biologia molecolare, e se ne è prospettato l'impiego terapeutico allo scopo di bloccare la progressione dell'infezione da HIV.

3.2.1. Struttura del CD4

Accurate indagini biochimiche e immunologiche hanno permesso di conoscere molti aspetti della struttura di questa molecola (Maddon e al. 1986). Essa consta di 433 aminoacidi ed è strutturata in 5 regioni, una transmembrana di 21 aa. che termina con una coda intracitoplasmatica di 40 aa. all'estremità carbossilica, e quattro esterne, simili ai domini variabili delle immunoglobuline e denominate, dall'esterno verso la membrana, V1, V2, V3 e V4 (v. fig 5).

Dei ponti sulfidrilici intracatenari stabilizzano i domini V1, V2 e V4. Numerosi distinti epitopi sono stati identificati nella molecola CD4 grazie a specifici anticorpi monoclonali e sono stati denominati T4A, B, C, D, E ed F.

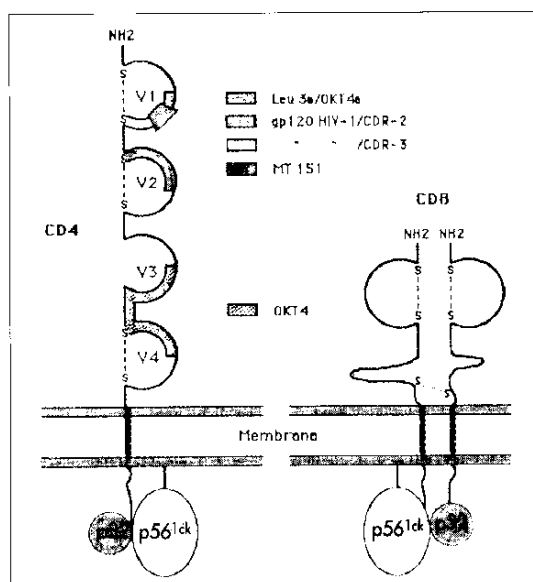


Figura 5. Struttura delle molecole CD4 e CD8 e delle proteine citoplasmatiche associate (v. testo). Per la molecola CD4 sono indicati i siti di interazione di alcuni moAbs e della gp 120 del HIV-1.

3.2.2. Ruolo HIV-recettoriale del CD4

Grazie alle tecniche della transfezione genica, della introduzione nel gene del CD4 umano di mutazioni deliberate, e della espressione di molecole CD4 chimeriche uomo-topo, è stato possibile stabilire che: 1) il dominio aminoterminale V1 (aa. 1-106) è essenziale per il legame con la proteina virale gp120; 2) la molecola CD4 si lega su un sito all'estremo C-terminale della gp120; 3) le molecole chimeriche si legano alla gp120 se i primi 100 aminoacidi della estremità NH2 della molecola CD4 sono quelli della CD4 umana, anche se tutto il resto della molecola è murina, ma non nel caso contrario; 4) 7 aminoacidi situati al centro del segmento di 100 aminoacidi appaiono costanti e essenziali sia per il legame della gp120 che per il riconoscimento da parte di anticorpi monoclonali come Leu3a e OKT4a (Peterson e Seed 1988). Questo sito, che rappresenta una piccola ansa nella porzione più distale della molecola, è distinto dai siti specifici per gli anticorpi monoclonali MT151 (dominio V2) e OKT4 (domini V3-V4). Indagini recenti hanno dimostrato che nel binding del CD4 con la gp120 sono particolarmente importanti gli aminoacidi 41 e 55 del primo e 397 e 439 della seconda. Gli aa. 41 e 55 sono inclusi in una sequenza con forte omologia con la regione CDR2 delle Ig (CDR= complementary determining region) che rappresenta un sito con alta affinità di legame con la gp120 (Eiden e al. 1992). Esistono anche altri siti del CD4 critici per il legame con la gp120, come la sequenza CD3-like 81-92 che sembra implicata nel fenomeno di fusione cellulare. Un altro punto di contatto tra le due molecole è localizzato nel dominio PND (Principal Neutralizing Domain: aa. 307-330) della gp120, ma non è ancora determinato nel CD4. Regioni coinvolte nella formazione dei sincizi tra cellule CD4⁺ sembrano presenti anche nel dominio V2 della molecola CD4 e nel dominio PND della gp120.

3.2.3. Ruolo immunologico del CD4

Per quanto attiene al ruolo svolto dalla molecola CD4 nei linfociti T sono state riconosciute due principali funzioni. Una è dipendente dall'estremità distale aminoterminale della molecola e riguarda il meccanismo di riconoscimento MHC-ristretto da parte del TCR-2. La seconda funzione è svolta dall'estremità prossimale, carbossiterminale, della molecola e riguarda il processo di attivazione dei linfociti T.

In effetti la molecola CD4 entra in contatto con un sito monomorfo del dominio 2 o 2 delle molecole HLA-DR e in generale di classe II, nel momento in cui il TCR-2 riconosce il peptide non-self presentato da queste molecole, e svolge la funzione di stabilizzare il contatto tra TCR-2 e molecola HLA (Rudd 1988; Emrich 1988; Strominger 1989). Essa è dunque un'importante mediatore dell'adesione cellulare, ruolo che sembra poter svolgere, anche se con bassa affinità, indipendentemente dal processo di riconoscimento dell'antigene da parte del TCR (Doyle e Strominger 1987).

Grazie alla presenza di un segmento intracitoplasmatico la molecola CD4 funge da trasduttore di segnali accessori nel complesso meccanismo di attivazione antigene-dipendente del linfocita T (Fleisher e Schrezenmeier 1988). Questo è dovuto a una particolare proteino-tirosino-chinasi, denominata $p56^{lck}$, che è strettamente associata con il segmento intracitoplasmatico del CD4, e che catalizza la fosforilazione a livello delle tirosine della catena del complesso CD3, realizzando così la trasduzione del segnale. Questo tipo di chinasi manca di una regione transmembrana ed è ancorato alla faccia interna della membrana cellulare per mezzo di un residuo glicina N-terminale legato a un acido miristico. Seguono una sequenza aa. che da specificità all'enzima, una regione catalitica altamente conservata, e infine un'importante regione regolatoria all'estremo carbossilico. Dei residui tirosinici chiave sono presenti nella sequenza C-terminale in posizione 505 e in un sito di autofosforilazione in posizione 394. La $p56^{lck}$ forma così con il CD4 (e anche con il CD8) un complesso molecolare che realizza una nuova classe di recettori proteino-tirosino-chinasi. La sua attività è stimolata dal legame del CD4 (o del CD8) con una molecola HLA presentante un antigene estraneo e interagente specificamente con il complesso TCR-CD3. La formazione del recettore CD4- $p56^{lck}$ è tuttavia indipendente dall'espressione sulla membrana del TCR-CD3, ma la sua attività è fisiologicamente dipendente dall'interazione che esso contrae con una molecola HLA di classe II durante il riconoscimento di un antigene estraneo da parte del TCR-CD3. La sua azione catalitica consiste nella fosforilazione delle tirosine dei segmenti intracitoplasmatici non solo delle catene , ma anche delle catene , e del CD3. Viene trasmesso così il segnale accessorio necessario per l'attivazione della cellula. L'azione della $p56^{lck}$ si differenzia dunque da quella delle altre proteino-chinasi attivate nella cellula in seguito al contatto specifico TCR/Ag-HLA. Queste infatti fosforilano i substrati (e in particolare le catene e del CD3, il CD4, il CD8 e la stessa $p56^{lck}$) in residui di serina e di treonina. L'attività della $p56^{lck}$ è sottoposta a meccanismi di modulazione. Infatti, la sua fosforilazione a livello dei residui tirosinici 505 e 394 o a livello dei residui di serina e di treonina, ne riduce l'attività; al contrario la sua defosforilazione operata dai domini intracellulari degli antigeni CD45R (questi agiscono come proteino-tirosino-fosfatasi) ne accresce l'attività catalitica e aumenta indirettamente la fosforilazione delle catene del CD3. Nell'insieme le molecole CD4 (o CD8),

CD45 e p56^{lck}, con il complesso TCR/CD3-p59^{fyn}, costituiscono un network di strutture interagenti tra loro che modula le risposte dei diversi subsets CD4⁺ a vari stimoli e l'espansione di subsets con distinti programmi immunoregolatori, mediante eventi di fosforilazione e defosforilazione (Rudd e al. 1989; Alexander e al. 1992).

Il segnale trasmesso fisiologicamente dalla molecola CD4 sarà un segnale positivo di attivazione e di proliferazione, sinergico con quello del complesso TCR/CD3-p59^{fyn}, quando il recettore CD4-p56^{lck}, defosforilato nei residui aa. critici, è coinvolto nel riconoscimento specifico dell'antigene in un aggregato multimerico che comprende TCR/CD3, CD2, CD4 e CD45. In assenza di interazione specifica tra TCR/CD3 e HLA/antigene, il segnale trasmesso dal CD4 sarà negativo.

3.2.4. Ontogenesi dei linfociti CD4

L'espressione sulla membrana della molecola CD4 è dimostrabile precocemente su timociti CD3⁺ e CD8⁺. Nel corso della maturazione successiva avviene una dicotomizzazione che differenzia i linfociti CD3 in due sottopopolazioni CD3⁺CD4⁺CD8⁻ e CD3⁺CD4⁻CD8⁺. Sono queste le cellule dette anche a singola positività, tutte caratterizzate dalla non espressione del CD1 (vedi fig. 1). Questo processo ontogenetico è anche indicato come ciclo CD1 negativo. Accanto a queste cellule che costituiscono la grande maggioranza dei linfociti T maturi, esistono piccoli subsets di cellule T dette a doppia positività, in quanto esprimono contemporaneamente il CD4 e il CD8. Sono cellule CD1⁺ che possono esprimere o meno il CD3, e che fanno parte di un ciclo ontogenetico detto ciclo CD1 positivo (De la Hera e al. 1989). Come è stato già sottolineato nel paragrafo relativo alle cellule col TCR-1, esiste anche un subset molto piccolo di cellule CD4⁻CD8⁻ dette a doppia negatività e che sono sempre CD3⁻. Il comportamento in citofluorimetria dei marcatori CD4 e CD8 in linfociti normali è presentato nella figura 7.

3.3. I subsets CD4

La coespressione di altri antigeni di membrana e in particolare degli antigeni CD45R (o 2H4) e CD29 (o 4B4) si accompagna a un differente orientamento funzionale dei linfociti CD4⁺. Dai primi studi è emerso che i linfociti CD4⁺ CD45R⁻, che coesprimono l'antigene CD29, hanno essenzialmente una funzione di tipo helper-inducer (Morimoto e al. 1985a, Rudd e al. 1989), mentre quelli che esprimono l'antigene CD45R (CD4⁺ CD45R⁺) hanno una funzione di tipo suppressor-inducer (Morimoto e al. 1985b, Rudd e al. 1989). Era stato infatti suggerito che le cellule CD4⁺2H4⁺ fossero la controparte umana delle cellule di topo TH1, e che le cellule CD4⁺2H4⁻ fossero la controparte dei linfociti TH2 del topo (Bottomly 1988). Le prime corrispondono ai linfociti T CD4⁺ cosiddetti infiammatori indispensabili per un'efficace immunità contro patogeni intracellulari e si caratterizzano per la capacità di sintetizzare e secernere IL-2 e IFN- γ , ma non IL-4 e IL-5. Le seconde, corrispondenti ai veri linfociti T helper del topo, sono invece essenziali per efficaci risposte immuni anticorpali contro patogeni extracellulari (Powrie e Mason 1988), e hanno la proprietà di produrre IL-4 e IL-5 ma non IL-2 e IFN- γ (Mosmann e al. 1986). Questa corrispondenza è stata però messa in dubbio in quanto

alcuni dati sembravano dimostrare che sia la funzione infiammatoria che la funzione helper potessero essere svolte da cellule $CD4^+2H4^-$, e che non ci fosse neppure a livello di produzione di linfocine una corrispondenza tra i subsets umani definiti dai fenotipi $CD4^+2H4^+$ e $CD4^+2H4^-$ e i subsets murini TH1 e TH2 (Rudd 1988). In particolare, la maggior parte dei cloni di linfociti T $CD4^+$ umani prodotti in vitro mediante stimolazione con PHA o con alloantigeni non si inquadravano nei subsets murini TH1 e TH2, ma mostravano delle caratteristiche differenti. Gli studi recenti di Romagnani (1992) hanno portato all'identificazione anche nell'uomo di subsets TH1 e TH2 con caratteristiche funzionali e di produzione di citochine molto simili a quelle del topo (vedi più avanti paragrafo 4.5). Attualmente sappiamo che tali subsets di linfociti T $CD4^+$ si differenziano tra loro anche nel fenotipo CD di membrana, e in particolare nel fenotipo CD45R. Questo è il risultato dell'espressione alternativa sulla membrana cellulare di un gruppo di molecole identificate come LCA (Leukocyte Common Antigen) o T200. Questo "antigene" è costituito da una famiglia di glicoproteine integrali di membrana che si differenziano mediante immunoprecipitazione in 4 bande corrispondenti a molecole di 180, 190, 205 e 220 kD. Gli anticorpi monoclonali "convenzionali" anti-CD45 reagiscono contro determinanti comuni agli antigeni di tutti e quattro i pesi molecolari, che sono espressi sui leucociti maturi e immaturi, compresi linfociti T e B, timociti, granulociti e macrofagi.

3.3.1. Il cluster CD45R

Tutti i membri della famiglia CD45 sono prodotti da un singolo gene, localizzato nel cromosoma 1, strutturato in 34 esoni. Tre di questi (A, B, C) sono sottoposti nel RNA primario a splicing alternativi che possono dar luogo a 8 differenti mRNA e a 8 differenti proteine, a seconda delle diverse combinazioni dei trascritti A, B, C (Rudd e al. 1989). Questi producono tre diverse sequenze aminoacidiche situate nell'estremo distale (extracellulare) della molecola, rispettivamente di 66, 47 e 48 aa. (v. fig. 6).

Le molecole CD45 che si ottengono comprendono una regione intracitoplasmatica di 707 aa. (che è una delle più lunghe finora identificate tra tutte le proteine di membrana), una regione transmembrana, e una regione esterna variabile di 552, di 504, 486, 438 o di 391 aa. La regione citoplasmatica possiede una intrinseca attività tirosino-fosfatase importante per la regolazione di vari cicli di attivazione, compresa l'attività tirosin-chinasica. Grazie a tale attività può essere rimosso il fosforo dai residui tirosina sulla proteina $p56^{lck}$, accrescendone l'attività catalitica (v. fig. 11).

La regione esterna nella sua porzione N-terminale può includere tutti e tre i segmenti ABC (552 aa.) o due di essi (AB, AC o BC di 504, 505 e 486 aa.) o uno solo (A, B o C di 457, 438 e 439 aa.), costituendo il gruppo di molecole CD45R. Quando nessuno dei tre segmenti è presente si ha la molecola $CD45R^-$ o $CD45RO$. Alcuni anticorpi monoclonali riconoscono specificamente le sequenze A, B o C: la sequenza A è riconosciuta dall'anticorpo anti-2H4 che definisce la specificità CD45RA, comprendente le molecole CD45 con i segmenti ABC, AB, AC oppure A; la sequenza B è riconosciuta dall'anticorpo PD7/26 che definisce la specificità CD45RB, presente nelle molecole con i segmenti ABC, AB, BC, o B; la molecola $CD45RO$ è riconosciuta dall'anticorpo UCHL1. Gli

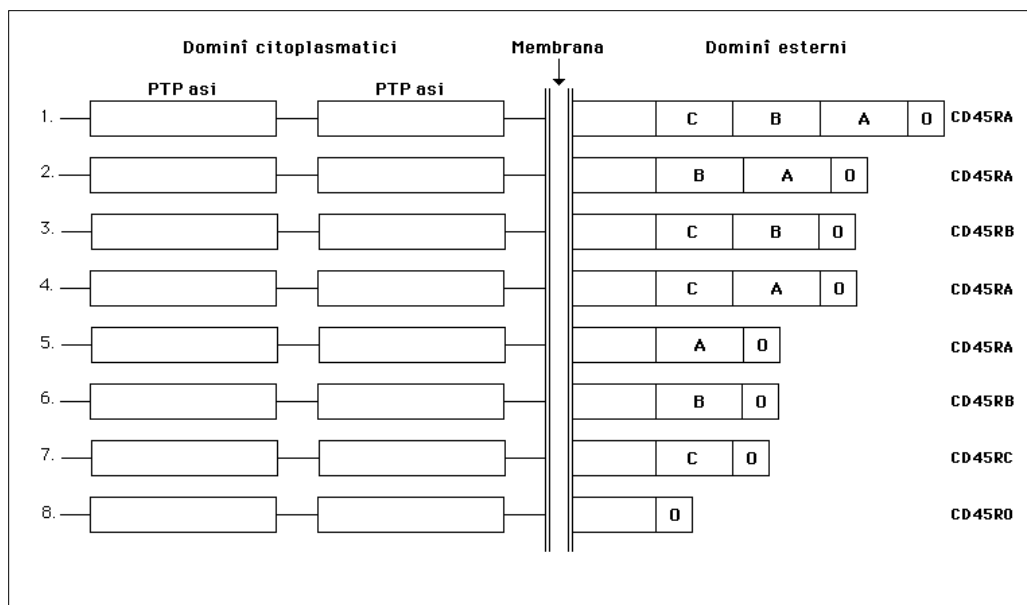


Figura 6. Struttura schematica delle 8 diverse isoforme possibili della molecola CD45R. Le isoforme 4 e 7 non sono state identificate nell'uomo (v. testo).

anticorpi monoclonali specifici per il cluster CD45R, detti anche “ristretti”, riconoscono solamente molecole espresse su subsets di linfociti T, di linfociti B e monociti. La specificità CD45RA è anche riconosciuta dagli anticorpi moAb G1-15, FB.11.13, 73.5, N017, N909, N914 e N915, la specificità CD45RB dagli anticorpi PT17/26/16 e PD7, e la specificità CD45RO dall'anticorpo NO31 (IVth International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna 1989). L'antigene CD45RA (p.m. 205-220 kD) caratterizza i linfociti T vergini, l'antigene CD45RO (p.m. 180 kD) è espresso sui linfociti TH memoria e sui linfociti TH effettori mentre l'antigene CD45RB è espresso nei linfociti TH1 e non nei linfociti TH2. Questo antigene è espresso oltrechè nei linfociti T anche in linfociti B, monociti e macrofagi in tre forme diverse di p.m. 190, 205 e 220 kD. Le principali differenze fenotipiche tra linfociti T vergini e linfociti T memoria sono indicate nella tabella 1.

La nomenclatura attualmente adottata per indicare i differenti fenotipi CD45R prevede per ciascuna specificità A, B, C, O due differenti livelli di espressione (H = high o positivo, e L = low o negativo). Si possono avere le specificità CD45RA^H, CD45RA^L, CD45B^H, CD45B^L, CD45C^H, CD45C^L, CD45O^H e CD45O^L. E' ovvio che la specificità CD45RA^H si associa sempre a CD45RO^L e che CD45RA^L si associa sempre a CD45RO^H. D'altra parte la specificità CD45RC non è per ora dimostrabile nell'uomo, ma la sua espressione è verosimilmente, come nel topo, parallela a quella del CD45RB.

Figura 7. Analisi citofluorimetrica con doppia marcatura di subsets linfocitari. Sulle ascisse sono rappresentati gli antigeni linfocitari marcati con fluoresceina (FL1) e sulle ordinate gli antigeni marcati con ficoeritrina (FL2). a = CD3⁺/CD4⁺; b = CD3⁺/CD8⁺; c = CD45RA⁺/CD4⁺; d = CD4⁺/CD8⁺; e ed f = CD57⁺/CD8⁺. Nei contour-plot e ed f sono riportati i subsets CD57⁺ e CD8⁺ determinati in pazienti HIV-1 positivi. E' evidente la presenza di una percentuale elevata di linfociti CD8⁺ attivati, data la coespressione in essi dell'antigene CD57. E' inoltre ben visibile, specialmente nella figura e la presenza di linfociti CD8 con alta, intermedia e bassa densità di antigene (v. testo).

Markers	CD45R			CD								Altri		
	A	B	0	2	7	44	29	58	54	25	26	LFA-1	MeI-14	DR
Vergini	+++	+++	-	++	++	±	+	+	-	-	-	++	+++	-
Memoria	-	±	+++	+++	±	+++	+++	++	++	±	+	+++	±	+

Tabella 1. Differenze fenotipiche tra linfociti T vergini e linfociti T memoria.

3.3.2. Il cluster CD29

Una proteina di membrana di p.m. 135 kD, denominata CD29 o 4B4, è riconosciuta da alcuni moAb specifici sul subset di linfociti T helper-inducer ed è coespressa con le molecole che definiscono il fenotipo $2H4^-$ o $CD45RO$, ma ne è del tutto distinta. Il subset di linfociti $CD4^+2H4^-$ non corrisponde infatti esattamente al subset di linfociti $CD4^+4B4^+$. La molecola CD29, riconosciuta specificamente dall'anticorpo monoclonale 4B4, costituisce la catena α della subfamiglia delle integrine VLA (v. parte prima). Si tratta di 6 differenti eterodimeri composti da una catena β costante rappresentata appunto dal CD29. Le integrine VLA mediano l'adesione delle cellule che le esprimono a ligandi della matrice extracellulare come laminina, collagene, fibronectina e a ligandi cellulari come l'adesina VCAM-1. Le integrine VLA-4, VLA-5 e VLA-6 sono espresse su linfociti T residenti. L'attivazione dei linfociti T ne aumenta il numero e l'affinità per i ligandi, e la loro interazione con questi fornisce segnali sinergici di attivazione ai linfociti T. Le integrine VLA-1 e VLA-2 sono espresse invece sui linfociti T attivati dei quali accrescono ulteriormente l'adesività. L'integrina VLA-4 favorisce inoltre l'homing dei linfociti T attraverso il legame con VCAM-1, che è espressa sulle cellule endoteliali delle venule ad alto endotelio. I due subsets di linfociti $CD4^+$, $CD29^+$ e $CD45R^+$, possono essere abbastanza ben determinati nella pratica con anticorpi monoclonali del commercio, fra i quali i più usati sono 4B4, UCHL-1 e AcMo5/9 per il subset $CD29^+$, e 2H4 e Leu18 per il subset $CD45R^+$ (Morimoto e al. 1985a,b; Shaw 1987; Gupta 1987; Vuillier e al. 1988). I valori percentuali medi dei due subsets $CD4^+$ negli adulti sani variano nelle diverse casistiche e in rapporto agli anticorpi monoclonali adoperati, ma in generale i linfociti $CD29^+$ prevalgono sui linfociti $CD45R^+$ e rappresentano una quota tra il 45% e il 69% del totale (vedi fig. 7), mentre i $CD45R^+$ oscillano tra il 38% e il 53% (Morimoto e al. 1985a,b; Gupta 1987; Vuillier e al. 1988; Kingsley e al. 1988).

La situazione è diversa nel neonato nel quale i linfociti $CD29^+$ sono assenti o molto diminuiti. Nel sangue del cordone ombelicale i linfociti $CD4^+$ sono in netta prevalenza $CD45R^+$ (Arras e al. 1989), e i linfociti $CD4^+ CD29^+$ aumentano progressivamente nei successivi 12-24 mesi fino a raggiungere le quote normali (Kingsley e al. 1988).

3.4. Il marcatore CD8

La molecola CD8 è una glicoproteina di superficie di 78 kD costituita da combinazioni diverse di due catene polipeptidiche di 34 kD denominate $CD8\alpha$ e $CD8\beta$, codificate nel 2° cromosoma. È dimostrabile nel 60% circa dei timociti, nel 25-35% dei linfociti T periferici e in un'altro 5-6% di linfociti periferici rappresentati da cellule NK. Diversi aspetti riguardanti questo marker restano ancora da precisare, e in particolare:

- 1) la sua conformazione e la sua differente espressione nei diversi tipi di cellule;
- 2) la sua associazione sulla membrana in complessi multimolecolari;
- 3) il suo ruolo funzionale nelle diverse cellule.

Le due catene, quasi identiche, sono organizzate in due domini esterni, di cui uno variabile di tipo immunoglobulinico, una porzione transmembrana e una coda intracitoplasmatica all'estremo carbossilico (Male e al. 1988). Esse sono legate tra loro in modo covalente a livello del dominio costante esterno (v. fig. 5). La molecola CD8 ha una

struttura differente in differenti stadi maturativi della cellula T. Nei timociti è espressa sia come omodimero CD8 sia come eterodimero (Male e al. 1988) che è legato con ponti S-S a molecole CD1 in un complesso ad alto peso molecolare (De La Hera e al. 1989; Blue e al. 1988). Nei linfociti T periferici è espressa o come omodimero / o come eterodimero (o multimer) / .

L'eterodimero è riconosciuto specificamente dagli anticorpi monoclonali T202, 2T8-5H7, mentre l' -catena è riconosciuta dagli anticorpi monoclonali T059, T166-T184 (IVth International Conference on Human leukocyte differentiation, Vienna 1989). In quote molto piccole di linfociti T periferici la molecola CD8 può associarsi con un ponte S-S alla catena pesante della molecola CD1, come nei timociti immaturi (De la Hera e al. 1989), ma i linfociti T del sangue periferico non esprimono normalmente la molecola CD1. Il legame CD8-CD1 comporta la trasmissione all'interno della cellula di un segnale accessorio negativo che annulla il segnale di attivazione trasmesso dal complesso TCR-CD3 in seguito al contatto con l'antigene. Viceversa nei linfociti T CD8 positivi che non coesprimono il CD1, la molecola CD8 trasmette all'interno della cellula un segnale accessorio positivo che traduce in segnale di attivazione il contatto del complesso TCR-CD3 con l'antigene presentato da una molecola HLA di classe I (v. fig. 8).

La trasmissione del segnale è resa possibile dal legame non-covalente che il CD8 contrae, nella sua coda intracitoplasmatica, con la molecola p56^{lck}, con la quale forma, in modo simile al CD4, un recettore proteino-tirosino-chinasi (v. parag. 3.2.3.). Nel processo di riconoscimento da parte del TCR la molecola CD8 si lega con la molecola HLA di classe I che presenta l'antigene non-self, stabilizzando il contatto TCR-HLA, analogamente al CD4 con la molecola HLA di classe II (Emmrich 1988).

Dati recenti sembrano dimostrare che la molecola CD8 può associarsi sulla stessa membrana cellulare non solo con il complesso CD1, ma anche con la catena pesante delle molecole HLA di classe I. Quindi la molecola CD8 può legarsi oltrechè con molecole HLA di classe I, che sulle cellule APC presentano peptidi non-self ai TCR , anche con molecole HLA di classe I presenti sulla stessa cellula, con funzioni non ancora definite (Blue e al. 1988). La formazione di un complesso fra CD8 e molecole MHC-like avviene precocemente nell'ontogenesi delle cellule T. Nel timocita immaturo il CD8 si lega, come abbiamo già detto al CD1. D'altra parte l'espressione delle molecole HLA di classe I nei timociti è bassa, e solo il 10-15% di timociti maturi esprime alti livelli di molecole di classe I. Al contrario queste molecole sono fortemente espresse sui linfociti maturi CD8⁺ dove normalmente non si trova la molecola CD1. E' stato suggerito che la molecola CD8 abbia una affinità per le molecole di tipo MHC di classe I in tutti gli stadi della differenziazione T, e che quando i timociti maturano c'è un switch da un'associazione con CD1 a un'associazione con catene pesanti delle molecole HLA di classe I (Blue e al. 1988). Le conoscenze sulla molecola CD8 nelle cellule NK sono ancora molto incomplete, sia per quanto riguarda l'esatta conformazione che la funzione. E' stato dimostrato che la densità della molecola sulla membrana cellulare consente di distinguere i linfociti T citotossici-soppressori, tutti CD3⁺CD16⁻, dai linfociti NK, tutti CD3⁻CD16⁺, essendo i primi ad alta densità di CD8 (CD8^{HD}) e i secondi a bassa densità di CD8 (CD8^{LD}) (Arras e Contu 1989). Un terzo subset di linfociti a densità intermedia di CD8 (CD8^{ID}) è meno ben definito sia sul piano funzionale che del fenotipo di membrana determinato in base alla coespressione di altri antigeni (vedi fig. 7).

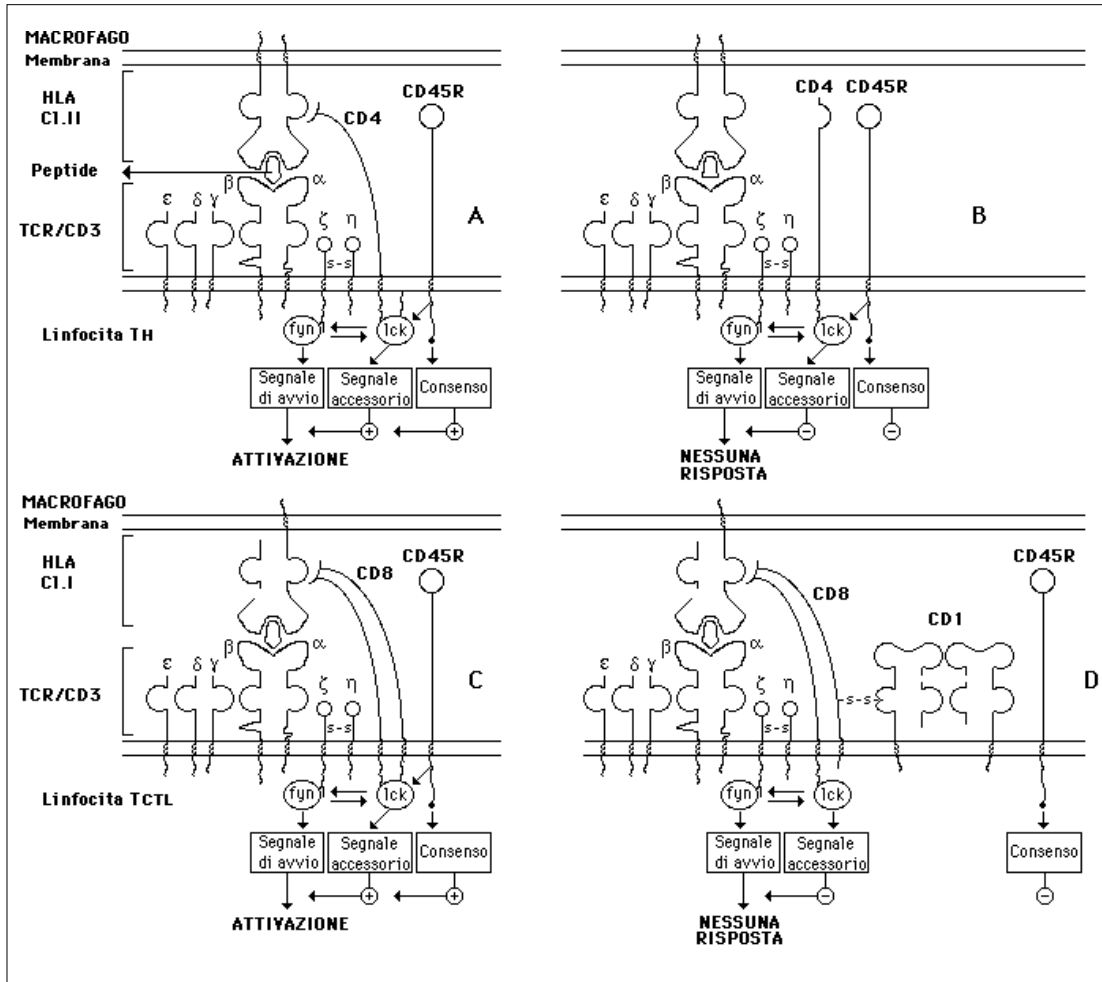


Figura 8. Modello schematico della trasduzione dei segnali di attivazione indotti dal riconoscimento dei peptidi e dei segnali accessori CD4, CD8 e CD45R mediati, nei linfociti TH e TCTL. In A il riconoscimento di un peptide da parte del TCR specifico da per mezzo della PTK $p59^{fyn}$ il segnale di avvio dell'attivazione. Il legame successivo del CD4 con la molecola HLA di classe II da per mezzo della PTK $p56^{lck}$ un segnale accessorio positivo. Il CD45R da un segnale positivo di consenso differenziato a seconda della sua struttura. In B in assenza di un riconoscimento specifico del peptide i segnali accessori trasmessi dal CD4 e dal CD45R sono negativi e non ci sarà alcuna risposta cellulare. In C la situazione è analoga a quella rappresentata in A e il segnale accessorio è dovuto al contatto del CD8 con la molecola HLA di classe I. In D il legame del CD1 col CD8 in un complesso multimolecolare inibisce il segnale accessorio trasmesso dal CD8 e la risposta cellulare. Per maggiori dettagli vedi testo.

In effetti alcuni ricercatori distinguono solamente due subsets di linfociti CD8 sulla base della densità e della coespressione degli antigeni CD3 e CD16: CD8^{bright} sono denominati quelli con alta densità di CD8 sulla membrana, che sono in grande maggioranza CD3⁺CD16⁻, e quindi linfociti T, e CD8^{dim} quelli con bassa densità di CD8, che sono in grande maggioranza CD3⁻CD16⁺, e quindi linfociti NK (Lanier e Loken 1984; Gebel e al. 1987). I linfociti CD8^{bright} includono i linfociti CD8^{HD}, ma comprendono anche linfociti CD3⁻CD16⁺ con intermedia densità di CD8. Così pure i linfociti CD8^{dim} includono i linfociti CD8^{LD}, ma comprendono anche linfociti CD3⁺CD16⁻ con intermedia densità di CD8. L'esistenza di un distinto, benchè eterogeneo, subset di linfociti CD8^{ID} appare evidente specialmente in soggetti con alta concentrazione di linfociti CD8 attivati, come nei pazienti HIV-1 positivi in stadio WR1-WR4 (Arras e Contu 1989). La coespressione dell'antigene CD57 contribuisce a tale distinzione (vedi fig. 7). Infatti la densità di CD57 nei linfociti CD8⁺ è spesso parallela alla densità del CD8, e cioè alta nei CD8^{HD}, intermedia nei CD8^{ID}, e bassa nei CD8^{LD}.

Come la molecola CD4, la molecola CD8 ha due funzioni principali: quella di molecola di adesione cellulare, e quella di trasduttore di segnali accessori positivi o negativi all'interno della cellula, in associazione con i segnali di attivazione del complesso TCR/CD3-p59^{fyn}, grazie al suo coinvolgimento in un complesso multimerico che comprende TCR/CD3, CD2, CD8/p56^{lck} e CD45. La prima funzione stabilizza l'interazione tra il complesso antigene-MHC di classe I e il TCR grazie al legame con un sito monomorfo del dominio 3 della molecola MHC di classe I.

La seconda si realizza con le modalità già viste per il CD4. I linfociti T CD8⁺ sono comunemente indicati come citotossici/soppressori in quanto vi sono cellule CD8⁺ che sopprimono la produzione di Ig in vitro, e cellule CD8⁺ con attività citotossica. Non è ancora chiaro se si tratta di due popolazioni distinte o di due stati funzionali diversi di una stessa popolazione cellulare. Sembra che la coespressione dell'antigene CD11b caratterizzi essenzialmente i linfociti CD8⁺ ad attività soppressiva, e che invece la coespressione dell'antigene CD28 riguardi i linfociti T CD8⁺ ad attività citotossica. Spiccata attività citotossica contro cellule infettate dall'HIV sembra essere conferita a questi linfociti dalla coespressione del CD29 (Tsubota e al. 1989). Gli anticorpi monoclonali anti-CD8 inibiscono in vitro l'attività citotossica sia antigene-specifica che da mitogeni.

3.5. Il complesso TCR/CD3/p59^{fyn}/CD4 o CD8/p56^{lck}

Il TCR-2 è strettamente associato sulla membrana cellulare con le molecole CD3/p59^{fyn}, CD4/p56^{lck} e CD45R nei linfociti T helper-inducer e con le molecole CD3/p59^{fyn}, CD8/p56^{lck} e CD45R nei linfociti T-citotossici, in due differenti complessi multimolecolari i cui componenti sono coinvolti in una rete di interazioni intermolecolari tra loro e con il complesso HLA-peptide, e partecipano direttamente alle fasi di riconoscimento, di attivazione, di selezione del programma di risposta immunoregulatorio o effettore-citotossico dei linfociti T (Rudd e al. 1989; Alexander e al. 1992; Harnett e al. 1992). Nel primo caso la molecola HLA riconosciuta è una molecola di seconda classe, mentre nel secondo caso è una molecola di prima classe (Janeway 1988). Non tutte le funzioni svolte dalle molecole in gioco sono completamente conosciute, ma quelle finora ben conosciute sembrano poter essere schematizzate nel modo seguente:

1. I complessi HLA self-peptide estraneo sono le chiavi indispensabili per “aprire” la serratura (TCR) di ciascun linfocita T. Esiste una sola chiave per ciascun linfocita (o clone linfocitario), e inoltre ciascuna chiave ha un segno di riconoscimento differente a seconda che debba servire per un linfocita TCD4⁺ o CD8⁺ (rispettivamente molecola HLA di classe II o di classe I);

2. La molecola TCR trasmette alle catene α e β della molecola CD3 il segnale di contatto specifico con il complesso HLA self-peptide;

3. La molecola CD3 trasmette alla proteina G p55 e alla PTK p59^{fyn} il segnale di contatto all'interno della cellula traducendolo, attraverso una serie di eventi biochimici, in segnale di avvio dell'attivazione dell'apparato funzionale della cellula (vedi paragrafo 4.3).

4. La molecola CD4 (o CD8) interagisce con la molecola HLA di classe II (o di classe I) riconosciuta insieme al peptide dal TCR, e:

a- stabilizza il contatto TCR/HLA-peptide;

b- seleziona il programma funzionale del linfocita T in senso immunoregulatorio (o in senso effettore);

c- trasmette all'enzima p56^{lck} il segnale di contatto adesivo con la molecola HLA;

5. La molecola p56^{lck} traduce il segnale ricevuto dalla molecola CD4 (o CD8) in segnale accessorio di esecuzione del programma funzionale della cellula, attraverso la sua attività tirosino-chinasica;

6. L'attività PTK delle molecole p59^{fyn} e p56^{lck} e il programma funzionale che viene eseguito dalla cellula in seguito a questi segnali associati, variano a seconda del tipo di molecola CD45R espressa, e dell'equilibrio tra defosforilazione e fosforilazione delle tirosine che ne deriva.

Come abbiamo già precisato nel paragrafo 3.4., studi recenti assegnano un ruolo importante alla coespressione o meno del marcatore CD1 sul segnale accessorio trasmesso dalla molecola CD8. Il recettore TCR $\alpha\beta$ o TCR-2, è specificamente riconosciuto da alcuni anticorpi monoclonali, il più noto dei quali è l'anti-WT31 che reagisce contro il 95-98% dei linfociti T del sangue periferico (tutti quelli che possiedono il recettore ma non quelli che hanno invece il recettore $\gamma\delta$ o TCR-1). Tuttavia l'osservazione di reazione dell'anticorpo anti-WT31 con cellule T $\alpha\beta$ - sembrerebbe indicare che questo anticorpo possa reagire con un epitopo variante del CD3 (Feldman 1988).

4. Funzioni delle Cellule T con Recettori

Le funzioni delle cellule T con recettore possono essere suddivise in due principali categorie dipendenti dalla presenza sulla membrana cellulare del recettore CD4 o del recettore CD8. La prima è di tipo immunoregolatorio e la seconda di tipo essenzialmente effettore. Entrambe presuppongono una fase iniziale, detta fase cognitiva, nella quale i linfociti T CD4⁺ riconoscono col TCR i peptidi antigenici presentati da cellule APC (principalmente macrofagi e linfociti B) con molecole HLA di classe II, e i linfociti T CD8⁺ riconoscono col TCR i peptidi antigenici presentati dalle cellule target con molecole HLA di classe I. Alla fase cognitiva segue una fase di attivazione nella quale i linfociti T CD4⁺: 1) secernono svariate citochine attive in parte sulle stesse cellule che le hanno prodotte e principalmente su altre cellule che devono finalizzare la difesa immunologica (T CD8⁺, B, NK, macrofagi e granulociti), 2) esprimono alcuni recettori sulla membrana, e 3) vanno incontro a proliferazione con un meccanismo essenzialmente autocrino. Queste fasi iniziali della funzione T linfocitaria, da una parte assicurano la specificità del riconoscimento degli antigeni estranei, e quindi della risposta immune, e dall'altra forniscono alle cellule effettrici già attivate un segnale immunoregolatorio che farà scattare i loro specifici programmi di attività.

I linfociti T CD4⁺ sono in grado di svolgere diverse attività immunoregolatorie, a seconda delle molecole accessorie espresse sulla loro membrana e del pattern di citochine che esse producono in seguito all'attivazione e cioè, attività helper-inducer nei confronti delle diverse cellule effettrici della difesa immune e attività suppressor-inducer nei confronti dei linfociti T CD8⁺ soppressori. I linfociti T CD8⁺ attivati svolgono nei confronti dei rispettivi bersagli, attività citotossica, soppressiva e probabilmente, ma in misura secondaria, anche attività immunoregolatoria, dipendente dalle citochine che sono in grado di produrre nei diversi casi.

4.1. Riconoscimento dei peptidi antigenici

Una prima ipotesi, ipotesi del doppio riconoscimento, proponeva l'esistenza di due distinte strutture recettoriali, una per l'antigene e una per il self MHC.

Una seconda ipotesi, ipotesi del riconoscimento in associazione, ammetteva l'esistenza di un'unica superficie recettoriale complessa con doppia specificità, una per l'antigene e l'altra per il self MHC.

Una terza ipotesi, del self modificato, che è una variante della seconda, presupponeva che la presenza dell'antigene estraneo determinasse una modificazione della conformazione della molecola MHC, così da renderla estranea e quindi riconoscibile da una sola specifica struttura recettoriale (Dausset e Pla 1985). Infine è stato anche ipotizzato che il TCR-2 possieda un solo sito specifico per il peptide estraneo, e la restrizione MHC sarebbe in questo caso il risultato della differente presentazione di un dato peptide da parte di ciascuna molecola HLA (Kourilsky e al. 1987) (fig. 9).

Attualmente si deve ammettere che il TCR-2 possieda una sola superficie recettoriale che consiste di due siti con specificità distinte, uno per il peptide presentato e l'altro per il self MHC (Strominger 1989). I dettagli sulle diverse superfici che entrano in contatto nell'interazione cognitiva tra HLA-peptide e TCR sono precisati nella fig. 9.

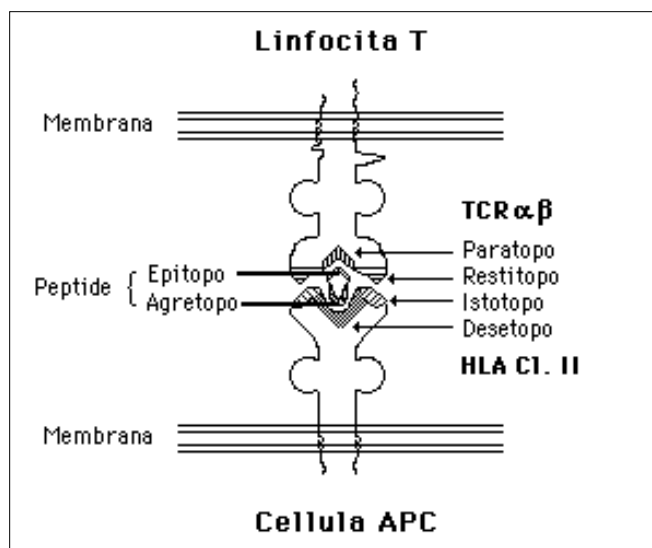


Figura 9. Riconoscimento dell'antigene da parte del TCR $\alpha\beta$ in restrizione HLA.

4.1.1. Gli antigeni riconosciuti dal TCR

I linfociti T con TCR riconoscono esclusivamente antigeni presentati da molecole HLA sulla membrana cellulare. Tali antigeni sono di natura proteica e consistono di piccoli peptidi derivati per processazione enzimatica da proteine generalmente estranee. Queste possono essere sintetizzate dalla stessa cellula presentante (proteine endogene) oppure assunte da questa dall'ambiente esterno (proteine esogene).

Le proteine vanno quindi incontro a frammentazione proteolitica in particolari strutture citoplasmatiche, con produzione di peptidi che vengono captati e portati in superficie dalle molecole HLA. I peptidi derivati da proteine endogene sono captati da molecole HLA di classe I e presentati a linfociti T CD8⁺. La loro dimensione media è di 9 aa. I peptidi derivati da proteine esogene sono captati da molecole HLA di classe II e presentati a linfociti T CD4⁺. La loro dimensione media è di 14 aa. Tra le due vie di presentazione possono esserci delle interconnessioni. Inoltre una proteina endogena può essere, in toto o in parte, espulsa dalla cellula APC, ricatturata e processata come proteina esogena. E' così possibile che peptidi di origine endogena siano presentati da molecole HLA di classe II a linfociti T CD4⁺.

Per maggiori dettagli sui meccanismi di processazione, trasporto e presentazione ai linfociti T dei peptidi antigenici, vedi Parte prima, capitoli 7 e 9.

Gli epitopi riconosciuti nei peptidi dai TCR sono epitopi lineari, cioè formati da residui aa. adiacenti nella sequenza primaria, esposti in superficie dalla molecola HLA. Molecole HLA diverse potranno esporre epitopi diversi di uno stesso peptide che saranno riconosciuti da cloni T differenti (v. fig. 10). Un dato peptide per essere fissato su una molecola HLA deve però disporre di particolari aa. che ne consentano l'ancoraggio (legami idrogeno) in posizioni critiche che possono variare da una molecola HLA all'altra. Pertanto solo determinati peptidi (e non tutti) possono essere presentati da una molecola HLA.

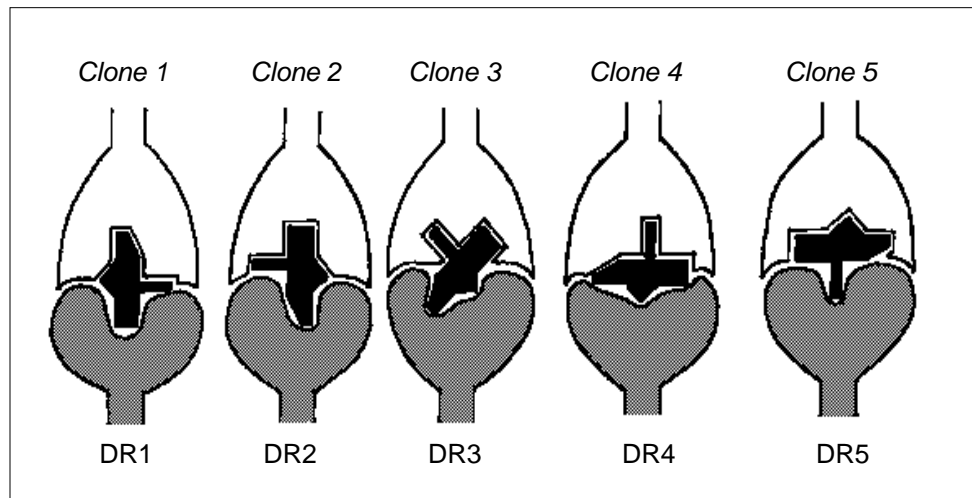


Figura 10. Interpretazione schematica della restrizione HLA nel riconoscimento da parte dei linfociti T di un peptide presentato da molecole DR differenti: un determinato peptide presentato da molecole HLA differenti è riconosciuto da cloni T differenti.

Alcuni linfociti T dimostrano specificità per piccole molecole reattive come il dinitrofenolo. Si tratta di apteni capaci di legarsi a proteine di superficie, comprese le molecole HLA. Tali complessi aptene-proteina possono essere riconosciuti da linfociti T.

Un problema particolare è quello del riconoscimento dei superantigeni. Si tratta in realtà di un'attivazione aspecifica dei linfociti T indotta da particolari antigeni, detti appunto superantigeni, che hanno la proprietà di stabilire un legame a ponte tra la superficie esterna di un'alfa elica della molecola HLA e la porzione distale della regione V del recettore TCR. Non c'è quindi un'interazione specifica tra superantigene e superficie idiomatica del TCR (paratopo). I superantigeni interagiscono però con particolari sequenze V presenti in TCR differenti e che in generale differiscono per ciascuno superantigene. Sono quindi "riconosciuti" da più cloni differenti di linfociti T e non da un solo specifico clone, come nel caso dei peptidi presentati dalle molecole HLA. Per questo abbiamo denominato i superantigeni induttori oligoclonali T per distinguerli dagli induttori monoclonali, come i peptidi, e da quelli policlonali, come i mitogeni.

Maggiori dettagli su questo problema sono dati nella Parte prima, capitolo 10).

4.1.2. Le cellule presentanti gli antigeni

Come abbiamo già più volte sottolineato, i linfociti T riconoscono specificamente gli antigeni estranei solamente nella forma di peptidi presentati da molecole HLA sulla membrana di altre cellule.

Le cellule che presentano i peptidi antigenici ai linfociti T, inducendone l'attivazione, sono di due tipi diversi, a seconda che presentino ai linfociti T CD4⁺ (T helper-inducer) o ai linfociti T CD8⁺ (T citotossici). Convenzionalmente, la denominazione di cellule

APC (antigen presenting cells) è riservata solo alle prime, mentre le seconde sono chiamate cellule target.

Le cellule APC devono la loro funzione specifica, da una parte, alla capacità di captare, internalizzare e processare gli antigeni, e dall'altra alla espressione costituzionale di molecole HLA di classe II sulla loro membrana. Le APC più comunemente in gioco nell'attivazione dei linfociti TH nell'uomo sono:

1) Macrofagi: cellule dotate di attività fagocitaria rappresentate in maggioranza negli organi linfatici periferici da macrofagi ricircolanti presenti nella midollare dei linfonodi e nella polpa rossa della milza. Hanno un ruolo importante nella cattura, nel trasporto agli organi linfatici periferici, nella processazione e nella presentazione degli antigeni in generale, e specialmente di quelli dei batteri e dei parassiti;

2) Linfociti B: grazie alle Ig di membrana possono legare l'antigene con alta affinità e quindi anche quando si trova a bassa concentrazione. Sono pertanto delle APC molto efficienti con un ruolo importante: a) nell'indurre l'attivazione dei T helper nei confronti di antigeni scarsamente presenti, e b) nella produzione di anticorpi TH-dipendenti;

3) Cellule interdigitate: localizzate nell'area T dei linfonodi e della milza esprimono sulla membrana molecole HLA di classe II in alta concentrazione, e sono molto efficaci nella presentazione degli antigeni ai linfociti TH. Sono dotate di forte potere stimolante nella MLR e si ritiene che siano importanti nelle risposte T linfocitarie contro molecole HLA allojeniche dei tessuti trapiantati.

4) Cellule di Langerhans: sono cellule ricircolanti della cute che catturano antigeni e li trasportano nei linfonodi regionali. Sono caratterizzate dalla presenza sulla membrana del marker CD1 e di alte concentrazioni di molecole HLA di classe II. Presentano efficacemente gli antigeni processati ai linfociti TH, specialmente quelli responsabili delle reazioni cutanee di ipersensibilità da contatto.

5) Cellule endoteliali venulari: esprimono molecole HLA di classe II e possono presentare peptidi antigenici a linfociti TH, svolgendo un ruolo importante nelle reazioni di ipersensibilità ritardata nei tessuti periferici (v. paragrafo 4.5.2.).

Altre cellule come cellule epiteliali, cellule dell'endotelio capillare, alcune cellule endocrine, cellule della glia, etc., possono presentare peptidi antigenici ai linfociti TH, comportandosi come cellule APC, in situazioni particolari in cui sono indotte ad esprimere molecole HLA di classe II dall'IFN- γ . Questo può avvenire in conseguenza della produzione di IFN- γ da parte di linfociti T attivati da antigeni, e da luogo a un incremento della presentazione degli antigeni e dell'attivazione T linfocitaria. Il risultato è l'amplificazione della difesa immune T-dipendente.

Le cellule target della risposta effettrice T linfocitaria sono tali in quanto capaci di:

- 1) sintetizzare proteine estranee (per es. virali);
- 2) processare tali proteine in peptidi di circa 8-10 aa.;
- 3) disporre di proteine di trasporto per la consegna dei peptidi antigenici a molecole HLA di classe I nel reticolo-endoplasmico;
- 4) produrre ed esprimere costitutivamente molecole HLA di classe I;
- 5) presentare ai linfociti T CD8⁺ il complesso molecola HLA classe I-peptide endogeno.

Virtualmente tutte le cellule nucleate esprimono sulla membrana molecole HLA di classe I, e sono in grado di produrre endogenamente proteine estranee, di processarle e di presentarle con le molecole HLA di classe I ai linfociti T CD8⁺. Cellule target dei linfociti T citotossici sono dunque potenzialmente tutte le cellule nucleate sede di infezione virale o di sintesi di proteine anomale (per es. tumorali).

Alcune citochine, come l'IFN- γ e il TNF α , possono accrescere l'efficacia dei linfociti TCTL contro le cellule target inducendo in queste una maggiore espressione delle molecole HLA di classe I.

4.2. Attivazione dei linfociti T

Il riconoscimento del peptide antigenico da parte del TCR con il coinvolgimento del complesso CD3 e delle molecole accessorie variamente implicate, produce una serie di fenomeni biologici che portano all'attivazione dei linfociti T.

L'interazione del complesso peptide-HLA con il complesso TCR-CD3 genera dei segnali intracellulari che aumentano transitoriamente la trascrizione di diversi geni normalmente quiescenti nei linfociti T a riposo. Si verifica così in queste cellule, specialmente in quelle CD4⁺, una transitoria produzione di proteine essenziali per la proliferazione e per le varie funzioni dei linfociti T e di altre cellule immunologiche. I linfociti TCTL invece rispondono allo stimolo peptide-HLA della cellula target con un rapido e transitorio rilascio di molecole già pre-formate, come le perforine. La produzione di citochine rappresenta per queste cellule un fenomeno di minore entità non ancora sufficientemente studiato (Weiss e al. 1987; Abbas e al. 1991). Pertanto nell'esposizione degli eventi che seguono alla attivazione antigenica dei linfociti T si farà essenzialmente riferimento ai linfociti T CD4⁺.

4.3. Eventi biochimici dell'attivazione

L'attivazione T cellulare comprende le seguenti tappe:

1. Trasduzione di segnali precoci;
2. Attivazione trascrizionale di diversi geni;
3. Espressione di recettori di citochine sulla membrana;
4. Secrezione di citochine;
5. Proliferazione.

4.3.1. Trasduzione di segnali precoci

La trasduzione del primo segnale, consistente nel riconoscimento del peptide antigenico da parte del TCR, all'interno della cellula, comporta vari eventi biochimici differenti che convergono tutti a determinare l'attivazione di geni codificanti per citochine, e quindi la produzione di citochine e la proliferazione della cellula. Essi sono:

- a) apertura di canali ionofori del calcio nella membrana cellulare con penetrazione

dei Ca^{++} all'interno delle cellule (v. pag. 16). Questo fenomeno può verificarsi attraverso meccanismi differenti. Il segnale di riconoscimento del peptide da parte del TCR sembra poter essere trasmesso a un recettore di membrana non ancora identificato che causa direttamente l'apertura dei canali dei Ca^{++} . Alternativamente si ritiene che il segnale trasmesso dal TCR alla catena α e all'omodimero β o all'eterodimero $\gamma\delta$ determini un cambiamento di conformazione dell'insieme delle catene componenti il CD3 con strutturazione di canali del calcio. Infine particolari molecole con attività ionofora, come la ionomicina, possono agire direttamente sulla membrana determinando l'apertura di canali del calcio. Come è stato già ricordato, all'aumento di concentrazione dei Ca^{++} nel citoplasma contribuisce anche il prodotto di degradazione del PIP2 (IP3) favorendo la fuoriuscita dei Ca^{++} dal reticolo-endoplasmico o da altri compartimenti intracellulari. Nel citoplasma i Ca^{++} in eccesso si legano a proteine con le quali vengono nuovamente pompate all'esterno riportando l'equilibrio ionico ai normali valori precedenti il riconoscimento dell'antigene peptidico. L'aumento di concentrazione dei Ca^{++} nel citoplasma causa attivazione di proteino-chinasi calcio-dipendenti che catalizzano la fosforilazione di proteine intracitoplasmatiche responsabili successivamente di attivazione genica come schematizzato nella fig. 11.

b) attivazione del complesso di trasduzione del segnale (CTS) costituito da alcune proteine G (p55 associata al TCR e p32 associata al CD4), e dalle proteino-tirosino-chinasi p59^{fyn} e p56^{lck} associate rispettivamente al CD3 e al CD4 (Alexander e al. 1992; Harnett e al. 1992). Questo complesso in cui le molecole interagiscono strettamente fra loro e la cui azione è modulata dal CD45R, producono i seguenti eventi biochimici:

1- attivazione della fosfoinositol-3-chinasi (PI-3K) e della fosfolipasi C 1 (PLC-1) con conseguente idrolisi del PIP2 in IP3 e DAG. L'IP3 favorisce il trasferimento dei Ca^{++} dal reticolo-endoplasmico e da altri compartimenti intracellulari nel citoplasma. Il DAG attiva una proteino-chinasi Ca^{++} -dipendente (PKC) che causa la fosforilazione di diverse proteine. L'aumento della concentrazione dei Ca^{++} nella cellula determina una sua fissazione sulla calmodulina, una proteina con 4 siti attivi per il calcio, che causa attivazione di una specifica proteino-chinasi Ca^{++} calmodulina dipendente.

2- attivazione dell'adenilciclasi con aumento della concentrazione di cAMP, il quale a sua volta attiva una fosforilchinasasi responsabile della fosforilazione di diversi enzimi e proteine.

Gli eventi biochimici ora ricordati: aumento di concentrazione di Ca^{++} e produzione di metaboliti (DAG e cAMP) capaci di attivare chinasi fosforilanti (proteino-chinasi e fosforilchinasasi), portano alla fosforilazione di numerose proteine che attivano gli enhancer di non meno di 70 geni differenti, molti dei quali responsabili della produzione di varie citochine e recettori di citochine.

La fosforilazione riguarda numerose proteine sia di membrana che citoplasmatiche. Gli enzimi maggiormente implicati in questo processo sono come abbiamo già precisato delle proteino-chinasi Ca^{++} e Ca^{++} -calmodulina dipendenti che operano la fosforilazione delle proteine a livello della serina, della treonina e della tirosina.

Un risultato analogo è ottenuto anche da altri enzimi fosforilanti come la fosforilchinasasi già ricordata, la tirosina-fosfochinasi (TPK) e la treonina-serinocinasasi le quali agiscono

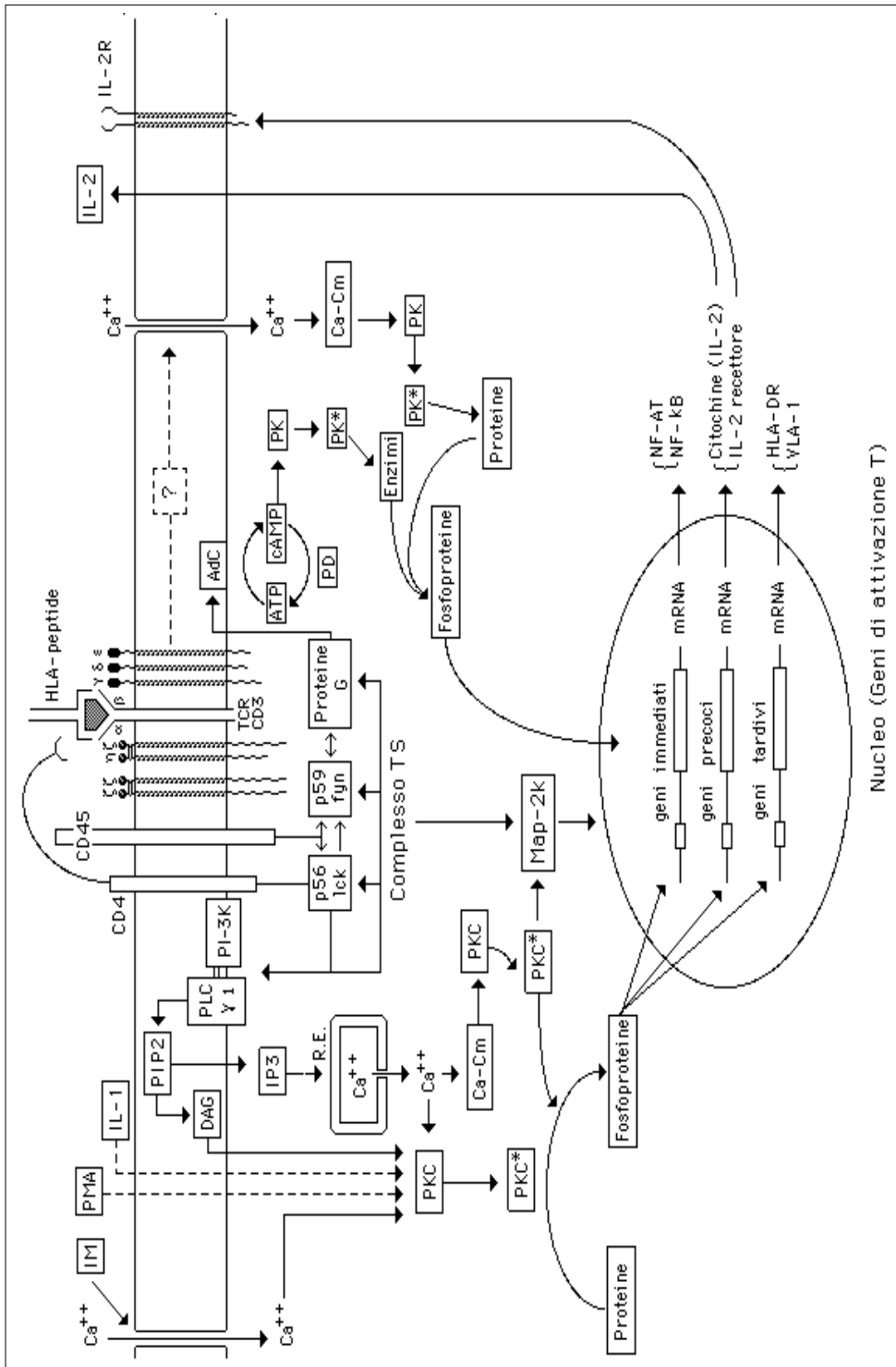


Figura 11. Schema del processo di attivazione T-cellulare antigene indotta. IM = ionomicina; PMA = forbol-miristato-acetato; IL-1 = interleuchina -1; IL-2 = interleuchina-2; IL-2R = recettore dell'IL-2; PIP2 = fosfatidinositol-bisfosfato; DAG = diacilglicerolo; PLC = fosfolipasi C; PI-3K = fosfoinositol-3 chinasi; AdC = adenil-ciclasti; IP3 = inositol-trifosfato, PK = protein-kinasi, PK* = protein-kinasi attivata; RE = reticolo endoplasmico; Ca-Cm = calcio-calmodulina; TS = trasduttore del segnale; PKC = protein-kinasi-C; PKC* = protein-kinasi-C attivata; NF-AT e NF-kB = fattori nucleari di attivazione di enhancer.

principalmente su alcuni segmenti intracitoplasmatici di proteine di membrana ricchi in serina, tirosina e treonina. Sono tra questi anche alcune proteino-tirosino-chinasi come la p56^{lck}, la p59^{fyn}, già ricordate e la p62^{yes} che sono di particolare importanza nell'attivazione dei linfociti T (v. paragrafo 3.2.3). La funzione delle molecole CD4 e CD8 come trasduttori del segnale accessorio di riconoscimento dell'antigene da parte del complesso TCR/CD3 dipende appunto dall'associazione del loro segmento intracitoplasmatico con la p56^{lck} che è espressa in alta concentrazione solamente nei linfociti T e dalle interazioni che questa PTK contrae con le altre componenti del CTS. Le molecole CD4 e CD8 avrebbero tra l'altro il compito di controllare la mobilità della p56^{lck} nella membrana e quindi la sua accessibilità alle catene del CD3 e agli altri substrati da fosforilare. La fosforilazione delle proteine è il risultato di un equilibrio dinamico tra le attività delle proteino-chinasi (fosforilanti) e quelle delle fosfatasi (defosforilanti). Le molecole sulle quali inizia la fosforilazione sono rappresentate dal complesso CD3/TCR e CD2. L'attivazione dei linfociti T induce la fosforilazione a livello della serina delle catene del CD3, come pure delle molecole di membrana CD4, CD8, CD45R e HLA, e di alcune molecole intracellulari, come le proteine citosoliche che rappresentano i maggiori substrati della proteino-chinasi C. L'attivazione dei linfociti T comporta anche la fosforilazione delle subunità del complesso CD3/TCR a livello della tirosina.

Anche alcune molecole di adesione sono coinvolte nel processo di fosforilazione che segue al riconoscimento del peptide antigenico da parte del TCR. Così per es. la catena della molecola LFA-1 è fosforilata e va incontro a cambiamenti conformazionali che ne accrescono l'affinità di legame.

I fenomeni di fosforilazione sono reversibili e quindi la cellula può ritornare allo stato inattivo una volta cessato lo stimolo iniziale.

Gli eventi ora ricordati si succedono in pochi secondi dopo il riconoscimento del peptide antigenico da parte del TCR. Altri eventi più tardivi meno conosciuti, come aumenti del pH intracellulare e variazioni nel metabolismo dei nucleotidi, possono contribuire all'attivazione T cellulare.

4.3.2. Attivazione trascrizionale di geni

Le proteine fosforilate agiscono sugli enhancer di non meno di 70 geni diversi inducendo la trascrizione e quindi la produzione e l'espressione dei rispettivi prodotti proteici. Questi geni sono stati suddivisi in base al tempo occorrente per la loro attivazione in:

a) geni immediati, che sono attivati in un tempo variabile fra 15 e 30 minuti. Questi sono rappresentati principalmente da proteine regolatorie nucleari. La trascrizione di questi geni non necessita di sintesi proteica. Fra questi sono di particolare interesse alcuni proto-oncogeni, come c-fos e il c-myc i cui prodotti sono dotati di attività regolatoria sulla crescita cellulare.

b) geni precoci, la cui trascrizione avviene in un tempo variabile da 30' a circa 20 ore, necessita di sintesi proteica e avviene prima della mitosi. Comprendono numerosi geni codificanti per citochine (IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6), per recettori (IL-2R, CD71 o recettore per la transferrina), per alcuni fattori di accrescimento cellulare (GM-

CSF) e per l'oncogene c-myb.

La trascrizione del gene IL-2, che è di particolare importanza per la proliferazione autocrina del linfocita T, è sottoposta a una regolazione complessa in cui intervengono i prodotti proteici degli oncogeni c-fos e c-jun come componenti del complesso proteico attivante la regione enhancer dell'IL-2, denominato AP-1. La stimolazione del TCR da parte dell'antigene peptidico presentato dai macrofagi si accompagna a un segnale co-stimolatorio dovuto alla produzione dell'IL-1 e può essere simulato dalla esposizione delle cellule alla PHA. E' stato dimostrato che la PHA induce la trascrizione dell'oncogene c-fos e che l'IL-1 induce la trascrizione di c-jun. Pertanto la combinazione di PHA e di IL-1 induce la produzione del fattore nucleare AP-1 analogamente a quanto si verifica nella condizione fisiologica. E' interessante sottolineare che l'effetto immunosoppressivo della Ciclosporina A si esercita sull'enhancer del gene IL-2 determinandone l'inibizione e sopprimendo pertanto la produzione dell'IL-2.

La trascrizione del gene IL-2R segue quella del gene IL-2 ed avviene in due momenti distinti e probabilmente con meccanismi diversi per le due catene integrali di membrana (p55 e p75) che lo compongono. Il gene codificante per la catena p55 ha un segmento enhancer 5' sul quale possono agire fattori nucleari PMA (forbolo-miristatoacetato), inducibili. Le conoscenze sulla regolazione trascrizionale del gene codificante per la catena p75 sono invece ancora incomplete. L'associazione delle due catene sulla membrana del linfocita T porta come è noto alla formazione dell'IL-2R ad alta affinità col quale interagisce l'IL-2 determinando la proliferazione.

c) geni tardivi, trascritti dopo la mitosi in un tempo di 3-14 giorni. Sono essenzialmente rappresentati dalle molecole HLA di classe II e da molecole di adesione tra cui VLA-1.

L'espressione sulla membrana dei linfociti T del recettore per IL-2, e la contemporanea produzione di IL-2 è responsabile della proliferazione autocrina dei linfociti CD4 attivati.

4.3.3. Proliferazione T linfocitaria

La tappa finale dell'attivazione antigene-indotta è rappresentata dalla proliferazione del linfocita T con TCR specifico per quel determinato antigene. Si avrà quindi un'amplificazione del clone T interessato, con capacità di risposta immunitaria specifica fortemente aumentata nei confronti dell'antigene in causa. L'attività mitotica è scatenata dal legame di alcune citochine, e in particolare dell'IL-2 o dell'IL-4, ai rispettivi recettori, e riflette la transizione del ciclo cellulare dalla fase Go o dalla fase G1 alla fase S.

La cellula entra nel ciclo cellulare per effetto dei fattori che interagiscono col complesso TCR-CD3-CD4 o CD8 e che sono stati definiti fattori di competenza, ma progredisce nel ciclo fino alla fase S per effetto dell'IL-2 o dell'IL-4 che sono stati appunto denominati fattori di progressione.

L'attivazione antigenica dei linfociti T vergini (o anche dei linfociti che si trovano in una fase successiva di differenziazione) da luogo, insieme all'amplificazione clonale dei linfociti T attivati e alla loro differenziazione in cellule T effettrici, anche allo sviluppo di linfociti memoria, che rappresentano uno degli aspetti più caratteristici e importanti della difesa immunitaria, e che assicurano una maggiore efficacia alla risposta immune

secondaria.

4.4. Linfociti T memoria

I linfociti nuovi che emigrano dal timo sono detti linfociti “vergini” e rimangono tali fino a quando incontrano un antigene specifico e ne sono stimolati. Essi diventano allora linfociti “memoria” a lunga vita (THm). Questo processo di attivazione linfocitaria si accompagna a cambiamenti transitori nei meccanismi di adesione che possono durare da qualche minuto ad alcuni giorni, e che sono in gran parte dipendenti da aumento di espressione e/o di avidità delle molecole CD2, CD58, LFA-1, CD44 e CD54 (v. Parte prima capitolo 6: Le molecole di adesione). Ma si verificano anche cambiamenti permanenti del fenotipo di membrana in conseguenza della transizione dei linfociti da “vergini” a “memoria” (vedi tab. 1).

Questo fenomeno è documentato meglio per i linfociti CD4 ma riguarda anche i CD8. I cambiamenti più importanti riguardano la molecola CD45RO, che aumenta nella sua espressione fino a 30 volte nei linfociti T memoria, la molecola CD45RA che è fortemente espressa nei T vergini e scompare del tutto o quasi nei T memoria, le molecole CD29, CD44 e ICAM-1, non espresse (o poco espresse) nelle cellule TH vergini, ma fortemente espresse nelle cellule TH memoria, e riguardano infine la molecola CD45RB. Anche le integrine VLA-4, VLA-5, VLA-6 aumentano di espressione da 2 a 4 volte nelle cellule memoria, mentre l'adesina Mel-14 perde totalmente la sua espressione e le molecole CD4, CD8 e CD3 non subiscono alcun cambiamento. L'aumento di espressione delle molecole ora ricordate persiste anche dopo che i linfociti ritornano nello stato di riposo e probabilmente dura per tutta la vita delle cellule memoria. Come si sviluppino le cellule THm non è chiaro. Esse possono prodursi durante una o più tappe dello sviluppo delle TH effettrici, oppure potrebbero derivare da cellule effettrici in una tappa successiva di differenziazione, o infine provenire da un set di precursori di cellule memoria pre-commissionati (cellule pre-memoria). Purtroppo non conosciamo le proprietà delle cellule mentre divengono cellule memoria, e possiamo solo valutare le cellule memoria quando persistono nello stato di cellule residenti. E' tuttavia probabile che una popolazione di cellule memoria emergenti abbia alcune caratteristiche fenotipiche della popolazione residente che è avviata a divenire. Così possiamo ritenere che le cellule pre-memoria siano cellule a lunga vita o di facile propagazione, che progrediscono verso lo stato di cellule residenti TH0, TH1 o TH2 e che di queste presentino in tutto o in parte il fenotipo di membrana e la produzione di IL-2. Queste previsioni sono state in gran parte confermate grazie anche alla dimostrazione che la citochina TGF- β induce selettivamente lo sviluppo di cellule memoria già commissionate.

I cambiamenti del fenotipo di membrana delle cellule T vergini a T memoria possono influire decisamente sulla loro localizzazione, indirizzandole in distinti microambienti, negli organi linfoidi, e verso differenti vie di ricircolazione e si accompagnano a differenze funzionali importanti, riassunte nella tabella 2.

FUNZIONE	Vergini	Memoria
Risposta proliferativa a: antigeni di richiamo	-	+++
moAb anti-CD3 e CD2	+	+++
Helper per produzione Ig (T CD4 ⁺)	-	+++
" per differenziazione cellule NK in LAK	-	++
Cellule pre-CTL (specifiche per antigeni)	+	+++
" pre-CTL (specifiche per alloantigeni)	+++	+++
" CTL (specifiche per alloantigeni)	-	+++
Risposta proliferativa a c. allogeniche	+++	+++
" " a mitogeni	+++	+
" " a c. autologhe	+++	+
Induzione della soppressione	+++	±
Induzione delle reazioni ritardate (DTH)	-	++
Aderenza all'endotelio/↑ permeabilità vascolare	+	+++
Risposta a stimoli chemotattici	+	+++
Inibizione proliferazione da moAb anti-CD25	++	+++
Produzione di IL-2 indotta da: PHA	+++	++/+++
PWM	+++	++
c. allogeniche	+++	++
stimolo su CD3	+++	++/-
Produzione di IL-4 indotta da: PHA	±	++/-
c. allogeniche	+	++/-
stimolo su CD3	±	++/-
Produzione di IFN-γ indotta da: PHA	-	-/++
c. allogeniche	-	-/++
stimolo su CD3	-	-/++
Produzione di IL-6 indotta da stimolo su CD2	-	+++

Tabella 2. Differenze funzionali tra linfociti T vergini e linfociti T memoria.

4.5. I subsets TH1 e TH2

In fase post-timica, i linfociti T CD4⁺, genericamente denominati T helper (TH), vanno incontro a una differenziazione funzionale a partire da un pool di linfociti T helper precursori (Thp). Questi, corrispondenti ai linfociti T vergini di fenotipo CD4⁺CD45RA^HB^HO^L, sono cellule a vita breve che, scompaiono nell'adulto dopo la perdita del timo e che secernono solamente IL-2. Queste cellule sono capaci di auto-rinnovarsi e di espandersi senza cambiamento del fenotipo.

Quando sono attivate con ConA diventano CD45RA^LO^H, ma ritornano al fenotipo originale quando cessa lo stimolo mitogenico. Dopo attivazione da parte di antigeni specifici, i Thp evolvono in grandi cellule, denominate TH0, capaci di produrre concentrazioni molto alte di IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e GM-CSF, e che sembrano avere un atteggiamento funzionale intermedio tra i linfociti TH1 e TH2. Questi originano dal pool dei Thp per un forte stimolo antigenico in presenza rispettivamente di IFN- γ (TH1) o di IL-4 (TH2). A loro volta le cellule TH PPD-specifiche sono deviate, in presenza di IL-4, dal fenotipo funzionale TH1 a quello TH0 o anche TH2, e le cellule TH allergene- o TES-specifiche (TES = Toxacara canis excretory-secretory) sono indirizzate dall'IFN- γ a differenziarsi in cellule TH0 o TH1, anzichè TH2 (Maggi e coll., 1992).

Anche altri fattori, come IFN- γ , IL-12, TGF- β , poly-I-C e il virus influenzale fanno evolvere le cellule TH allergene- o TES-specifiche in cellule TH0 o TH1, ma non TH2 (Romagnani 1992). Le cellule TH1 hanno il fenotipo CD45RB^H, mentre le cellule TH2 hanno il fenotipo CD45RB^L. Dal pool dei linfociti Thp originano dopo stimolo antigenico anche i linfociti T helper memoria o THm, che sono cellule a lunga vita con caratteristiche fenotipiche e orientamento funzionale differente a seconda dell'antigene stimolante e delle citochine operanti. In presenza di IFN- γ si sviluppano linfociti memoria orientati in senso TH1, di fenotipo CD45RA^LB^HC^HO^H, mentre in presenza di IL-4 si sviluppano linfociti memoria orientati in senso TH2, di fenotipo CD45RA^LB^LC^LO^H.

E' stato suggerito che la differenziazione delle cellule TH verso il fenotipo funzionale TH1 o TH2 sia determinata dal profilo delle citochine prodotte nella risposta immune "naturale" (Romagnani 1992). In effetti un'infezione da parte di virus e di batteri intracellulari determina la produzione di alte concentrazioni di IFN- γ , sia stimolando direttamente le cellule NK, sia attivando nei macrofagi la secrezione di IFN- γ e di IL-12, che a loro volta inducono la produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK e dei linfociti T. Come abbiamo già detto, l'IFN- γ fa differenziare le cellule TH a TH1. D'altra parte, allergeni, infezioni parassitarie, e altre situazioni caratterizzate da alti livelli sierici di IgE, sembrano essere responsabili della differenziazione da TH a TH2, attraverso l'induzione di secrezione di IL-4 da parte di mastociti e basofili.

Uno schema della differenziazione funzionale post-timica dei linfociti TH è presentato nella figura 12.

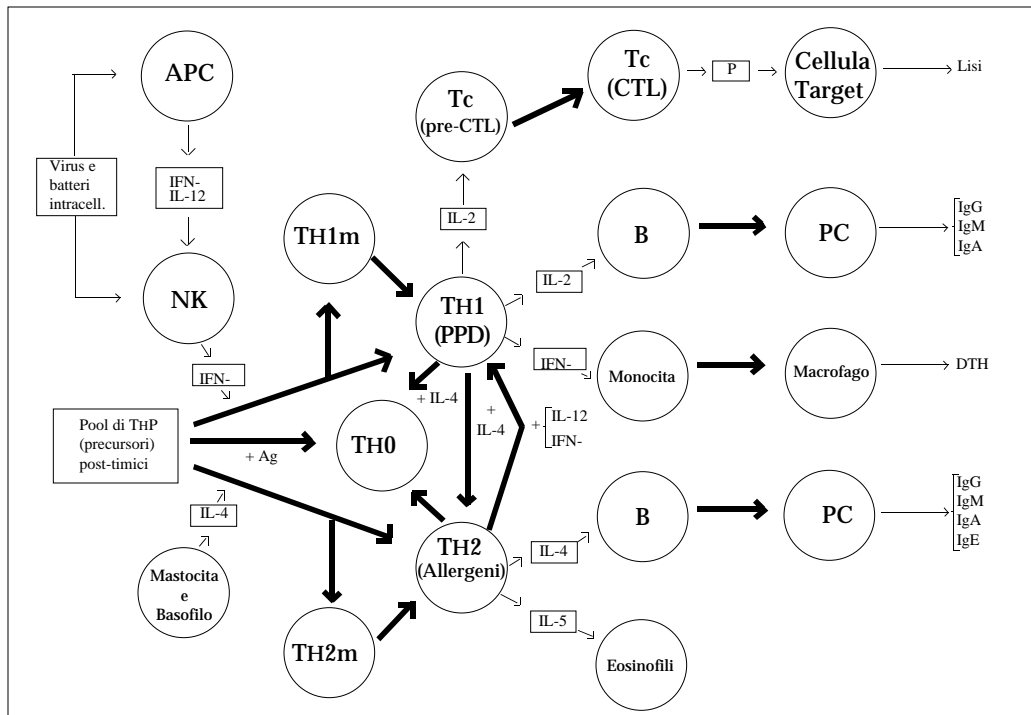


Figura 12. Differenziazione funzionale post-timica dei linfociti TH. P= perforine; PC= plasmacellule. Le citochine all'interno di riquadri sono prodotte dalla cellula che le precede e agiscono sulle cellule che le seguono, come indica la direzione delle frecce a tratto sottile. Le frecce in grassetto indicano la differenziazione funzionale delle cellule indotta dalle citochine a cui esse sono esposte (p. es. + IL-4). Per i dettagli vedi testo.

4.5.1. Proprietà funzionali dei subsets TH1 e TH2

I subsets TH1 e TH2 sono stati riconosciuti nell'uomo attraverso la produzione di cloni T specifici per particolari antigeni e caratterizzati dalla produzione di due distinti patterns di citochine sovrapponibili a quelli precedentemente identificati nel topo.

Il subset TH1 è rappresentato da linfociti specificamente responsivi ad antigeni batterici (come PPD, Streptochinasi, Borrelia, Tossoido tetanico e Lepromina), fungini (come Candida albicans) e virali (come virus influenzale), che producono sotto stimolazione antigenica IFN- γ e di solito anche IL-2, TNF- α e TNF- β , ma non IL-4 e IL-5 (o solo tracce di esse).

Il subset TH2 è rappresentato da linfociti con sensibilità specifica ad allergeni vari (cellule di individui atopici) e ad antigeni di parassiti, come elminti (TES), che rispondono alla stimolazione antigenica con produzione di alte quantità di IL-4 e IL-5, e anche di IL-3, IL-6, IL-10 e GM-CSF. Quantità modeste di IL-3, IL-6, IL-10 e GM-CSF sono prodotte anche dalle cellule TH1.

I subsets TH1 e TH2 differiscono tra loro nelle risposte alle citochine. L'IFN- γ inibisce

selettivamente la risposta proliferativa e la produzione di citochine delle cellule TH2, mentre l'IL-4 potenzia la risposta proliferativa agli antigeni e la produzione di citochine delle cellule TH2, ma non delle TH1.

A differenza del topo, nell'uomo l'IL-10 produce in entrambi i subsets inibizione della proliferazione e della produzione di citochine antigene-dipendente.

Dopo stimolazione con PHA, compare attività citolitica nella grande maggioranza delle cellule TH1 e solo in una minoranza delle cellule TH2. Inoltre i cloni TH1 lisano i linfociti B autologhi EBV-trasformati e inibiscono la produzione di Ig in modo proporzionale all'attività litica.

I due subsets differiscono anche nell'effetto help sui linfociti B: in presenza dello specifico antigene, i linfociti TH2 inducono da parte dei linfociti B autologhi principalmente la sintesi di IgM, IgG1, IgA e IgE, mentre i linfociti TH1 inducono la sintesi di IgM, IgG2 e IgA, ma non di IgE. Inoltre la sintesi di Ig è direttamente proporzionale al numero di cellule TH2, e inversamente proporzionale al numero di cellule TH1 aggiunte nel test di base.

4.5.2. Funzioni immunoregolatorie dei subsets TH1 e TH2

Le funzioni dei linfociti T CD4⁺ sono tradizionalmente distinte in funzione "helper" e funzione "inducer", o anche in funzione "helper-inducer" e funzione "suppressor-inducer". Con la denominazione "helper" viene indicata di solito la funzione di ausilio o di cooperazione che i linfociti T CD4⁺ forniscono ai linfociti B per la produzione di anticorpi. L'espressione "inducer" è usata per definire l'induzione che i linfociti T CD4⁺ danno ad altre cellule immunologiche per l'espletamento delle loro funzioni, come ai linfociti T CD8⁺ per le attività citotossica e soppressiva, ai monociti per l'attività DTH e alle cellule NK per l'attività LAK. Alcuni autori usano i due termini helper e inducer come sinonimi, e altri riservano l'espressione di "funzione inducer" all'attivazione di altri tipi di cellule T da parte di linfociti T CD4⁺. Infine, in analogia a quanto stabilito nel topo, la funzione "helper-inducer" indica la funzione di induzione ausiliaria della attivazione fornita dai linfociti T CD4⁺CD45RO ad altre cellule immunocompetenti, mentre la funzione "suppressor-inducer" indica la funzione di induzione della attività di linfociti T soppressivi da parte dei linfociti TCD4⁺CD45RA.

Benchè tali distinzioni non rappresentino in modo adeguato la realtà funzionale delle diverse cellule TH, vengono ancora oggi mantenute dalla maggior parte degli autori.

Le funzioni immunoregolatorie dei subsets TH1 e TH2 dipendono strettamente dalle citochine che essi producono in conseguenza di uno specifico stimolo antigenico.

A. Subset TH1

Le cellule appartenenti al subset TH1 esprimono il fenotipo CD4⁺ CD45RA^LBH^CCHOH.

Come è stato già precisato esse producono essenzialmente quantità elevate di IFN- γ , IL-2 e TNF. Questo pattern di citochine conferisce a queste cellule la proprietà di svolgere quel tipo di funzioni genericamente comprese nel termine di funzioni inducer, che si esprimono in:

- 1) Induzione delle risposte di ipersensibilità ritardata (DTH), per la quale è stata

supposta l'esistenza di uno specifico sottogruppo di cellule TH denominate T-DTH. Questo non ha però finora alcuna prova sperimentale. Nella DTH le cellule che presentano l'antigene ai linfociti TH1 sembrano essere cellule residenti, specializzate, come le cellule di Langerhans della epidermide, i macrofagi residenti nel derma, o le cellule endoteliali che rivestono le venule post-capillari. Dopo attivazione da parte delle appropriate APC, le cellule TH1 mediano la DTH attraverso l'azione di 3 citochine: l'IL-2 che induce proliferazione autocrina e paracrina dei linfociti T attivati, il TNF che, in sinergia con l'IFN- γ , attiva le cellule endoteliali venulari, richiamando dal circolo leucociti e monociti nel sito interessato dove causano infiammazione, e l'IFN- γ che induce nelle cellule APC una maggiore espressione delle molecole MHC di classe II, aumentando così l'efficienza della presentazione dei peptidi antigenici alle cellule TH1, e attiva fortemente i macrofagi che sono le vere cellule effettrici della DTH.

2) Induzione dell'attività effettrice delle cellule T citotossiche CD8⁺. Le cellule pre-CTL, attivate dal contatto con lo specifico antigene presentato da molecole HLA di classe I, sono indotte a differenziarsi in CTL, che proliferano e attaccano le cellule target, grazie all'azione dell'IL-2 prodotta dai TH1.

3) Attivazione delle cellule NK a cellule LAK per effetto dell'IL-2.

4) Induzione di amplificazione e differenziazione di linfociti B, con produzione di modeste quantità di IgM, IgG1 e IgA, ma non di IgE. Questo è dovuto alla combinazione dell'effetto helper dell'IL-2 e dell'effetto inibitore dell'IFN- γ sui linfociti B e al fatto che il pattern citochinico prodotto dai TH1 è privo di capacità stimolante sui linfociti B residenti e può indurre proliferazione di modesta entità solo su linfociti B previamente attivati (Abbas e al. 1990).

5) Induzione di attività soppressiva. Questo tipo di attività può essere svolta sia da cellule TH1 che TH2, e poichè le azioni soppressive indotte da questi due subsets di linfociti T sono in parte antagoniste e correlate l'una con l'altra, ci è parso preferibile trattare questo problema contemporaneamente per i due subsets in un apposito paragrafo (vedi più avanti).

B. Subset TH2

Il subset di cellule TH2 si caratterizza dal punto di vista fenotipico come CD4⁺CD45RA⁺BLCL⁺OH⁺, dal punto di vista del pattern citochinico prodotto, per la secrezione in alta concentrazione di IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e in concentrazioni modeste di IL-2 e IFN- γ . Per quanto riguarda le funzioni, sono le cellule maggiormente responsabili dell'azione helper sui linfociti B per la produzione delle immunoglobuline. Esse antagonizzano inoltre le cellule TH1 e in particolare l'induzione della DTH. Le funzioni di questo subset sono strettamente correlate con i diversi tipi di citochine prodotte. L'IL-4 è responsabile in modo predominante dell'effetto help sui linfociti B e della soppressione della DTH, l'IL-5 induce eosinofilia, e l'IL-10 inibisce la proliferazione delle cellule TH1 e la secrezione di IL-2 e IFN- γ da parte di tali cellule. Le cellule TH2 possono fornire "help" ai linfociti B attivati da un antigene con due modalità differenti. Una prevede un contatto diretto B-TH2 mediato dal peptide antigenico presentato dal linfocita B, e la conseguente attivazione del linfocita TH2, con secrezione di citochine. L'altra prevede solamente l'azione sui linfociti B, delle citochine prodotte dai TH2, senza contatto tra le

cellule.

Nel primo caso i linfociti B presentano ai linfociti TH2 peptidi derivati dalla processazione di antigeni precedentemente captati con le Ig di membrana e internalizzati. Ciascun linfocita TH2 è attivato in questo caso da un peptide derivato dallo stesso antigene che ha attivato il linfocita B presentante, agisce su quel solo linfocita B in rigorosa restrizione HLA, e la risposta è altamente specifica. Il segnale di avvio della proliferazione sembra esser dato ai linfociti B dai domini intracitoplasmatici delle molecole HLA di II classe che presentano i peptidi. Il segnale trasmesso all'interno della cellula determina l'ingresso di questa nel ciclo cellulare. Si ritiene comunque che siano in gioco anche altri fattori non definiti. Le citochine prodotte dai TH2 sono invece responsabili dell'attivazione del processo proliferativo e della differenziazione dei linfociti B in plasmacellule.

Nel secondo caso, i linfociti TH2 sono attivati da peptidi presentati da altre cellule APC, come i macrofagi, e ciascuno di essi può fornire il segnale ausiliario a più linfociti B attivati che si trovano in vicinanza, qualunque sia l'antigene attivante e senza restrizione HLA. Il segnale ausiliario è dato dalle citochine che il TH2 secerne e in particolare da IL-4, IL-5 e IL-6, che inducono i linfociti B a proliferare e a differenziarsi in plasmacellule. Queste producono anticorpi di tipo IgM per azione delle interleuchine IL-4, IL-5 e IL-2, di tipo IgG per azione di IL-4, IL-6, IL-2 e IFN- γ , di tipo IgA per azione di IL-5, IL-2 e TGF- β , e di tipo IgE per azione dell'IL-4.

La sensibilità, oltreché la specificità della risposta anticorpale, è di grado molto elevato nel primo caso poiché, non solo la cellula TH2 che fornisce l'help e il linfocita B che lo riceve sono attivati dallo stesso antigene, ma il linfocita B, grazie alle Ig di membrana, può captare con alta specificità gli antigeni, anche quando la loro concentrazione è molto bassa, per poi processarli e presentarli, in forma di peptidi alle cellule TH. Nel secondo caso la specificità e la sensibilità della risposta anticorpale sono di grado minore, poiché i macrofagi captano gli antigeni a concentrazione più alta dei linfociti B e poiché le interleuchine prodotte dai TH2 agiscono su linfociti B contigui o vicini, ma la cui attivazione può essere stata indotta anche da antigeni del tutto differenti da quelli in gioco nell'attivazione dei TH2.

Anche i linfociti TH1 possono interagire direttamente e in restrizione HLA con i linfociti B che presentano l'antigene specifico. Ma l'help che essi sono in grado di fornire per la produzione di anticorpi è di grado modesto.

4.6. Funzione T citotossica

La grande maggioranza dei linfociti dotati di effetto citolitico antigene-specifico (CTL) è costituita da linfociti T CD8⁺. Essi riconoscono specificamente peptidi endogeni presentati da molecole HLA self di classe I. Raramente dimostrano effetto citolitico antigene-mediato anche dei linfociti T CD4⁺, che riconoscono peptidi esogeni presentati da molecole HLA self di classe II. La coespressione dell'antigene CD28 caratterizza dei linfociti T CD8⁺ ad alta attività citotossica.

4.6.1. Maturazione funzionale delle CTL

I linfociti T CD8⁺ quando lasciano il timo, benchè dispongano di recettori TCR

funzionali, capaci di riconoscere specificamente un particolare peptide estraneo, ed esprimano sulla membrana le molecole ausiliarie CD3 e CD8, mancano completamente di attività citolitica. Essi lasciano il timo in uno stadio di pre-CTL e necessitano di due distinti segnali per divenire CTL funzionali. Il primo segnale è rappresentato dall'interazione cognitiva specifica tra il complesso TCR-CD3-CD8 e il peptide presentato su una cellula target da una molecola HLA self di classe I. Il secondo segnale è fornito dalle citochine prodotte dai linfociti T CD4⁺, e in particolare dai TH1, attivati da peptidi specifici presentati su molecole HLA di classe II da cellule APC. Il primo segnale induce la sintesi e l'espressione sulla membrana della subunità p55 del IL-2R, rendendo la cellula pre-CTL sensibile all'azione dell'IL-2 che, insieme all'IFN- γ , all'IL-6, e forse ad altre citochine, spinge la cellula pre-CTL a differenziarsi in cellula CTL funzionale. Questa tappa differenziativa si accompagna all'acquisizione da parte della cellula di particolari granuli citoplasmatici, associati alla membrana, che contengono: 1) delle proteine essenziali per la lisi della cellula target, e in particolare la perforina o citolisina e la linfofossina; 2) dei proteoglicani essenziali per la protezione delle CTL da possibili danni autologhi dovuti alle perforine, e in particolare il proteoglicano-condroitinsolfato A o protettina; e 3) delle serino-esterasi. Contemporaneamente la cellula sviluppa la capacità di produrre citochine, come l'IFN- γ e l'IL-2, sia pure in piccole quantità.

4.6.2. Meccanismo della citolisi

L'uccisione della cellula target da parte delle CTL avviene con due meccanismi diversi, in sei tappe successive, che cominciano con l'interazione specifica, antigene-mediata, tra CTL e cellula target, e terminano con la morte di quest'ultima per lisi osmotica e/o apoptosi nucleare.

Prima tappa. La cellula CTL riconosce col TCR il peptide specifico esposto in superficie dalla cellula target, con una molecola HLA di classe I, e si lega stabilmente a questa grazie all'interazione adesiva tra la molecola CD8 e la molecola HLA.

Seconda tappa. Il segnale di riconoscimento del peptide da parte del TCR è trasmesso all'interno della cellula dal CD3 ed avvia la sequenza di eventi biochimici che porta all'attivazione della cellula CTL (vedi paragrafo 4.3).

Terza tappa. L'interazione tra alcune molecole di adesione espresse sulla membrana della cellula CTL, come CD2, LFA-1, ICAM-1, VLA-4, VLA-5 e VLA-6, e i ligandi specifici presenti sulla cellula target, come LFA-3, ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1, oppure sulla matrice extra-cellulare, come la fibronectina e la laminina, ha due effetti importanti:

- 1) accentua e stabilizza maggiormente il contatto tra la cellula CTL e la cellula target;
- 2) fornisce alla cellula CTL segnali stimolatori accessori che favoriscono e incrementano la sua attivazione.

Quarta tappa. La cellula CTL trasporta e concentra i granuli verso l'area di contatto con la cellula target, e libera, per esocitosi, il contenuto di questi sulla membrana della cellula target. Le molecole di perforina si trovano nei granuli in forma di monomeri e sono veicolate da proteoglicani nel citoplasma fino alla membrana, che viene così protetta. A livello della membrana della CTL i proteoglicani rimangono aderenti ad essa e liberano le molecole di perforina all'esterno della cellula.

Quinta tappa. Le molecole di perforina penetrano nella membrana della cellula target e, a contatto con ioni calcio, alle normali concentrazioni extracellulari, vanno incontro a polimerizzazione formando dei canali tubulari che attraversano tutto lo spessore della membrana della cellula target, con un meccanismo simile a quello del C9 del complemento.

Sesta tappa. In presenza di un numero sufficiente di pori nella membrana, la cellula target non può impedire la penetrazione di Na^+ ioni e acqua, e va incontro a rigonfiamento osmotico e lisi.

Indipendentemente dal rilascio della perforina per esocitosi, le CTL possono secernere, a contatto con la cellula target, delle tossine, e in particolare la linfotossina (LT), che penetrano all'interno della cellula target dove attivano degli enzimi che idrolizzano il DNA. La cellula target va così incontro a un processo di frammentazione del nucleo noto come apoptosi.

Il processo di rigonfiamento osmotico da poliperforine e quello di apoptosi da LT possono complementarsi nel determinare la morte della cellula target.

4.7. Funzione T soppressiva

Numerosi dati sperimentali sembrano dimostrare l'esistenza di attività regolatorie di tipo soppressivo svolte da linfociti T sulle diverse fasi della risposta immunitaria, sia cellulare che umorale. Tradizionalmente si è ritenuto che la funzione T soppressiva fosse appannaggio di particolari linfociti T CD8^+ che sono stati denominati linfociti T soppressori (Ts). Tuttavia i numerosi tentativi effettuati finora non hanno consentito di identificare, e tanto meno di isolare, un subset di linfociti T CD8^+ al quale potesse essere specificamente assegnato il ruolo di cellula soppressiva. Così non è stato possibile studiare i caratteri biochimici o i prodotti secreti da tali cellule, né è stato possibile ottenere dei cloni stabili o degli ibridomi di cellule con specifica attività soppressiva.

E' sembrato pertanto possibile che il ruolo di cellula soppressiva venga svolto normalmente da cellule T CD8^+ , identiche alle cellule T citotossiche, che, in particolari situazioni, possono mettere in opera dei meccanismi capaci di inibire, specificamente e/o aspecificamente, la risposta immunitaria a diversi livelli. E' alternativamente possibile che le cellule T soppressive non siano un'unica popolazione linfocitaria, ma che consistano di linfociti T differenti dotati di differente specificità recettoriale per cui alcuni riconoscono peptidi in restrizione HLA, altri sono specifici per isotipi o per allotipi o per idiotipi delle Ig. In realtà il problema appare ancora più complesso in quanto alla realizzazione delle funzioni T soppressive sembrano partecipare, con ruoli non sempre ben definiti, e con meccanismi spesso ipotetici, sia linfociti T CD8^+ che linfociti T CD4^+ , e gli strumenti molecolari con i quali operano la soppressione sembrano essere, di volta in volta, recettori espressi sulla membrana, recettori solubili o porzioni di essi, citochine, e fattori di soppressione (TsF) non ancora caratterizzati sul piano molecolare, né ben documentati sul piano funzionale. In alcuni casi sembra essere in gioco una rete complessa di interazioni cellulari e di vari fattori induttori e soppressori prodotti dalle cellule. Nonostante questa complessità e i non pochi elementi di incertezza, e perfino di ambiguità, che rendono difficile ridurre in termini chiari e schematici il problema, è stato possibile stabilire alcuni punti abbastanza chiari in merito ai fattori in gioco nella soppressione e ai meccanismi di questa, delineare i principali circuiti di soppressione, e proporre alcuni modelli interpretativi che tengano conto della maggior

parte dei dati osservati.

4.7.1. I principali circuiti soppressivi

Sembrano esistere due opposti circuiti soppressivi denominati: uno di Retrosoppressione, in cui i bersagli principali della soppressione sono i linfociti TH, e il cui risultato finale è la soppressione delle risposte immuni TH dipendenti; e l'altro di Controsoppressione, in cui i bersagli sono le cellule T soppressive, e il risultato finale è la salvaguardia delle risposte immuni TH dipendenti. In questo caso, la cellula induttrice antigene-specifica è un linfocita T CD8⁺, e la cellula effettrice, detta anche cellula controsoppressiva (Tcs), è un linfocita T CD4⁺. Le cellule Tcs sembrano presenti principalmente nella milza di animali iperimmunizzati, di neonati e di animali privati di cellule Ts, come pure in animali con autoimmunità indotta con timectomia o con attivazione policlonale.

Per quanto riguarda la retrosoppressione, possono essere distinti due circuiti differenti e, in una certa misura, antagonisti tra loro. Schematicamente, i linfociti T sono stati distinti in due tipi (tipo 1 e tipo 2), sia per quanto riguarda i linfociti T CD4⁺ che i linfociti T CD8⁺, con funzioni e pattern di citochine prodotte differenti. Un circuito di retrosoppressione ha come cellule d'avvio le cellule TH1 che, da una parte antagonizzano le cellule TH2 inibendo l'effetto helper su B linfociti, e dall'altra inducono i linfociti TSE2 (linfociti T effettori della soppressione di tipo 2) a sopprimere la DTH. Il secondo circuito di retrosoppressione ha come cellule d'avvio le cellule TH2 che antagonizzano le cellule TH1, inibendo la produzione di IL-2 e di IFN- γ , e quindi l'effetto induttivo sui linfociti B e sulle cellule responsabili della DTH (v. fig. 13).

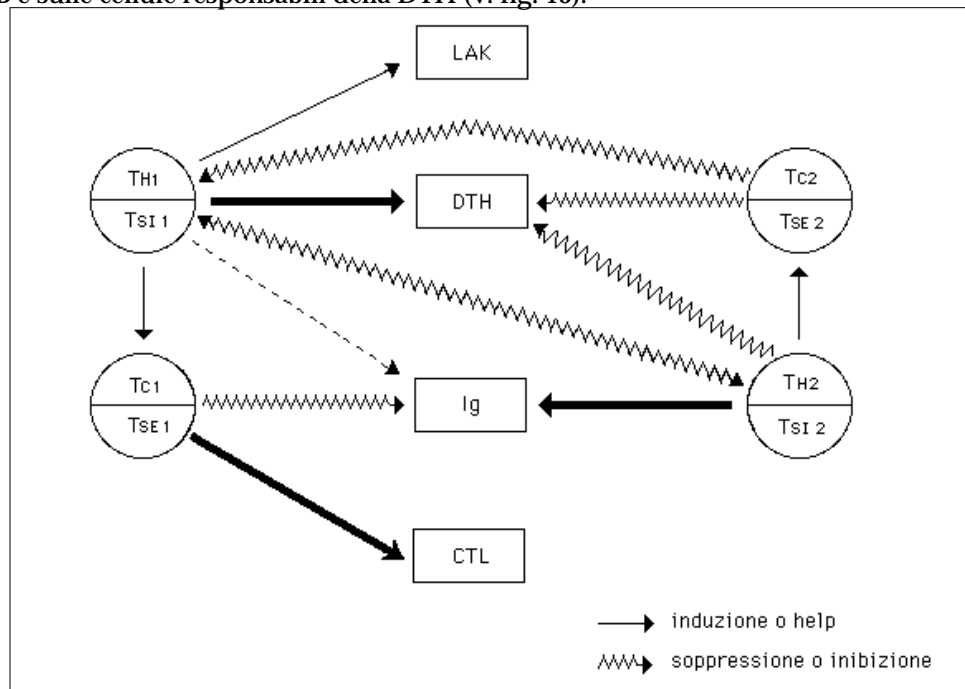


Figura 13. Funzioni principali e interrelazioni dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ di tipo 1 e di tipo 2 (v. testo).

4.7.2. I fattori della soppressione

Spesso una risposta soppressiva è ottenuta in condizioni di immunizzazione che causano anergia clonale dei linfociti, come alte concentrazioni di antigeni proteici o di apteni somministrati senza adiuvanti o iniettati endovena. Tali condizioni sembrano favorire interazioni dirette tra antigeni e linfociti, senza presentazione da parte di cellule APC e dunque in assenza di molecole HLA.

Talvolta dei superantigeni portati su molecole HLA di classe II di cellule immunocompetenti, come linfociti B, macrofagi e linfociti T attivati, possono interagire con regioni V di TCR presenti in cloni T linfocitari differenti, determinandone la soppressione (v. Parte prima parag. 10.2). Ma al di là di queste circostanze particolari non fisiologiche in cui possono verificarsi fenomeni di soppressione della risposta immunitaria, i dati principali abbastanza ben definiti sui fattori cellulari e umorali normalmente in gioco nella soppressione T-dipendente sono i seguenti (v. fig. 14 e 15):

1- Le cellule Ts effettrici (TSE) sono generalmente cellule T CD8⁺. Alcune di esse esprimono recettori per idiotipi di Ig o di TCR e fanno parte di un network idiotipico autoregolantesi. Molte sono antigene-specifiche, ma il riconoscimento dell'antigene da parte delle cellule soppressive non è sempre MHC ristretto e sembra poter avvenire talvolta in assenza di cellule APC.

2- Le cellule TSE diventano operative per l'intervento di cellule Ts-inducer CD4⁺ (TSI) che, in generale non effettuano direttamente la soppressione. Le cellule TSI fanno parte dei linfociti TH1, e sono anche denominati Ts1. Poiché anche linfociti TH2 possono indurre soppressione, per evitare possibili confusioni, sarebbe opportuno designare le cellule Ts-inducer di tipo 1 come TSI1, e le cellule Ts-inducer di tipo 2 come TSI2.

3- Le cellule TSE si suddividono in Ts2, anti-idiotipo specifiche e in Ts3 antigene specifiche, non HLA ristrette.

4- L'induzione delle cellule TSE da parte delle cellule TSI avviene in condizioni differenti da quelle delle cellule TCTL da parte delle cellule TH. Infatti le cellule più efficienti per l'attivazione delle cellule TSI sono i macrofagi. Questi inoltre si differenziano da quelli che presentano alle TH per una maggiore sensibilità ai raggi UV e alla ciclofosfamide, perché sono attivi in concentrazioni 10 volte inferiori, e perché interagiscono con le cellule TSI con restrizione HLA-DQ.

5- Il fattore TGF- conferisce alle cellule APC la capacità di attivare le cellule TSE. Il TGF- è normalmente presente in siti privilegiati come il liquido cerebrospinale, il liquido amniotico, e l'umore acqueo. Questo spiega forse perché i macrofagi residenti nel cervello e nell'occhio inducono risposte T soppressive.

6- La tappa finale della soppressione antigene-dipendente è aspecifica ed è mediata da citochine come l'IFN- γ , nel caso delle cellule induttrici Ts1, o l'IL-4, il TGF- e l'IL-10, nel caso delle cellule Ts2 e Ts3.

7- Un particolare meccanismo di soppressione aspecifica è dovuto a determinati fattori di soppressione denominati TsF. Ne sono stati descritti tre sulla base di dati sperimentali raccolti principalmente nel topo.

Il primo, denominato TsF1, è un fattore idiotipico, antigene-specifico, con restrizione

per la regione variabile della catena pesante delle Ig (Ig VH). Sembra essere costituito da una porzione della catena α (o anche β) del TCR. Sembra essere prodotto dal linfocita Ts1 sotto lo stimolo dell'antigene specifico presentato da un macrofago. Agisce sul Ts2, che è una cellula intermedia della soppressione, inducendone l'attività tramite presentazione da parte di una particolare cellula APC denominata FPC1 (factor presenting cells). Questa è resistente ad alte dosi di radiazioni (500 R) e a basse dosi di ciclofosfamida ed esprime sulla membrana molecole DQ e FcR. Il secondo, denominato TsF2, è un fattore anti-idiotipo prodotto dal linfocita Ts2, rielaborato e presentato da una cellula FPC2 al linfocita Ts3 (che è la cellula effettrice della soppressione) in restrizione HLA-DQ.

Il terzo fattore, denominato TsF3, è probabilmente un insieme di linfocine prodotto dal linfocita Ts3 sotto lo stimolo congiunto del TsF2 presentato dal macrofago FPC2 e dell'antigene specifico presentato da un'altra cellula APC. Il TsF3 agisce in modo aspecifico sopprimendo l'attività dei linfociti B, dei linfociti TH1 e dei linfociti TCTL (v. fig. 15).

4.7.3. I meccanismi della soppressione

In quale modo avvenga la soppressione nei diversi casi è ancora in gran parte da precisare.

Il rilascio di fattori soppressivi idiotipo-antiidiotipo (TsF1, TsF2 e TsF3) a cascata, capaci di determinare soppressione di linfociti B, TH e TCTL è probabilmente uno dei principali meccanismi di retrosoppressione, ma mancano finora prove sicure nell'uomo (vedi fig.15).

E' possibile che molecole TCR rilasciate dalle cellule T in forma solubile si leghino agli antigeni presentati sulle cellule APC da molecole HLA e che inibiscano competitivamente l'attivazione dei linfociti T sia CD4⁺ che CD8⁺.

Le cellule soppressive possono espletare la loro azione producendo quantità elevate di citochine con azione inibitoria su un determinato bersaglio. Così per es., l'IFN- γ inibisce la proliferazione dei linfociti B, la produzione di IgE in risposta a IL-4, e la proliferazione dei linfociti TH2; il TGF- β è un potente inibitore della proliferazione dei linfociti, sia T che B; l'IL-10 inibisce la produzione di IL-2 e di IFN- γ da parte dei TH1; e l'IL-4 inibisce l'induzione della DTH da parte dei TH1. Pertanto, a seconda delle proporzioni relative delle citochine prodotte in una determinata situazione, un linfocita T potrà causare effetti soppressivi, più o meno selettivi, su altri linfociti.

Un altro meccanismo col quale potrebbero agire le cellule soppressive risiede nella loro capacità (non dimostrata peraltro in vivo) di adsorbire, e quindi di ridurre la concentrazione, dei fattori necessari per determinate funzioni delle cellule immunologiche. Così, per es., l'espressione sulla membrana di alcuni linfociti T di un gran numero di recettori IL-2R ad alta affinità, potrebbe causare l'adsorbimento di quantità elevate di IL-2, impedendo la stimolazione di altri linfociti e sopprimendo l'attuazione di varie risposte immuni.

Un particolare fenomeno regolatorio suggerito da alcune ricerche sperimentali è quello che va sotto il nome di fenomeno "veto". Si tratterebbe di un processo non definito nella sua natura per il quale alcuni linfociti T sarebbero capaci di inibire in modo HLA

ristretto il loro riconoscimento da parte di altri linfociti T. Questo potrebbe avvenire o per un mascheramento di determinati epitopi o per un'inattivazione del recettore T della cellula effettrice. Si tratta però anche in questo caso di ipotesi del tutto speculative che non hanno una precisa documentazione.

Infine l'attività soppressiva può essere il risultato dell'attività citolitica T linfocitaria. Linfociti TCTL possono lisare specificamente linfociti B e linfociti TH che presentino su molecole HLA di classe I antigeni estranei (per es. peptidi endogeni derivati da proteine virali, come il virus EBV e il virus HIV-1). Anche le cellule TH1 sono capaci di lisare in vitro i linfociti B autologhi EBV-trasformati. L'attività citolitica può essere anche conseguente alla secrezione di citochine, come il TNF e la LT, da parte di linfociti T.

4.7.4. Modelli interpretativi

Sono stati proposti diversi modelli interpretativi degli eventi cellulari e molecolari che stanno alla base della soppressione T dipendente della risposta immunitaria. Vengono schematicamente illustrati nelle figure seguenti quelli che sembrano tener conto in modo più completo e coerente dei dati immunologici disponibili.

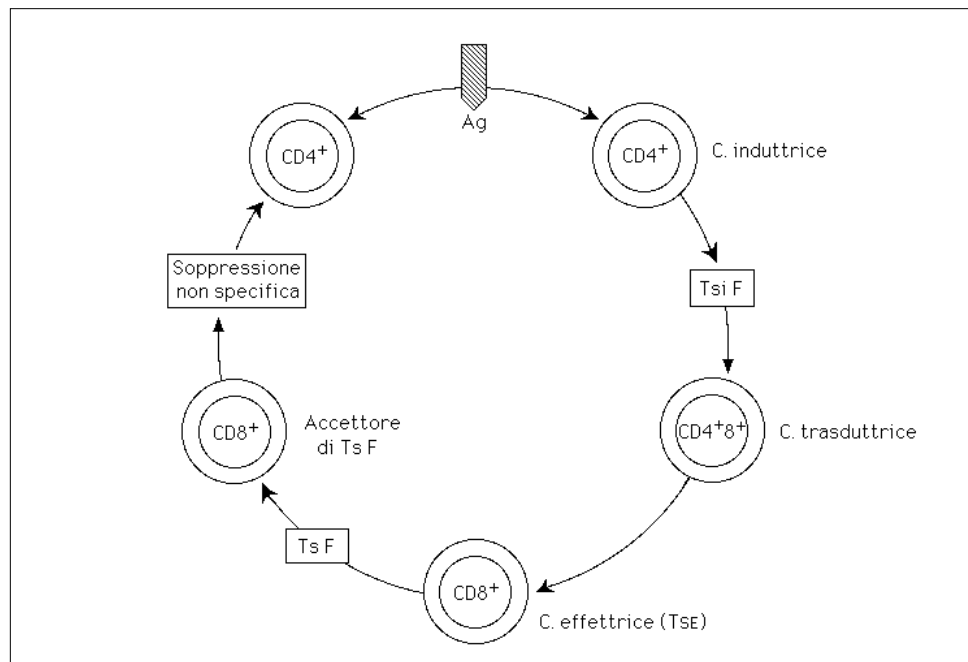


Figura 14. Modello schematico del meccanismo della retrosoppressione antigene-indotta. Ag = antigene; TsiF = fattore T di inibizione della soppressione; Tse cellula T effettrice della soppressione; TsF = fattore T soppressivo.

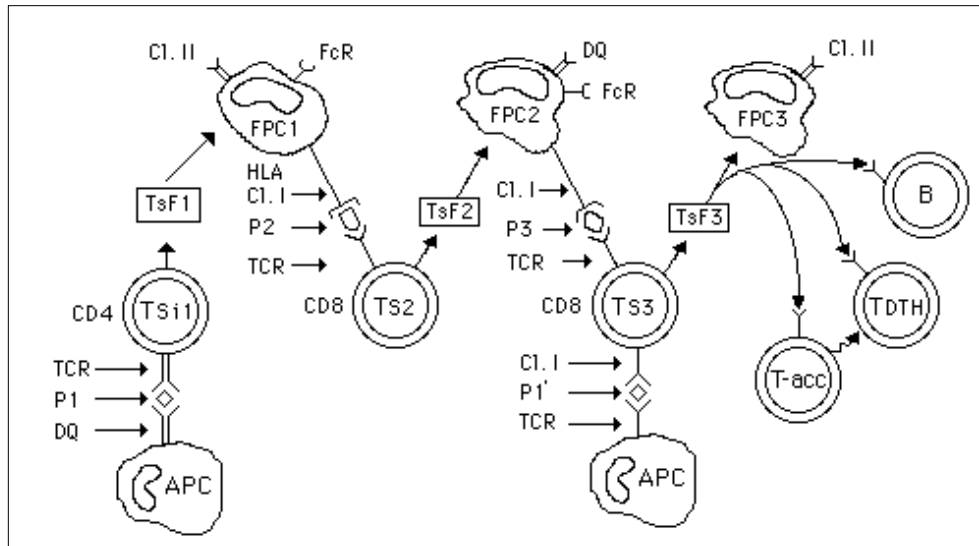


Figura 15. Retrosoppressione T cellulare per interazione idiotipo-antiidiotipo (modificata da Bloom e coll. 1992). P1 = peptide di antigene estraneo o di aptene; APC = macrofago presentante l'antigene; Tsi1 = T CD4 induttore della soppressione; TsF1, TsF2 e TsF3 = fattori T soppressivi prodotti rispettivamente da Tsi1, Ts2 e Ts3; FPC = cellule presentanti i fattori TsF; T-acc = cellula accettrice del fattore TsF3; Cl. I e Cl. II = molecole HLA di classe I e II (per i dettagli v. testo).

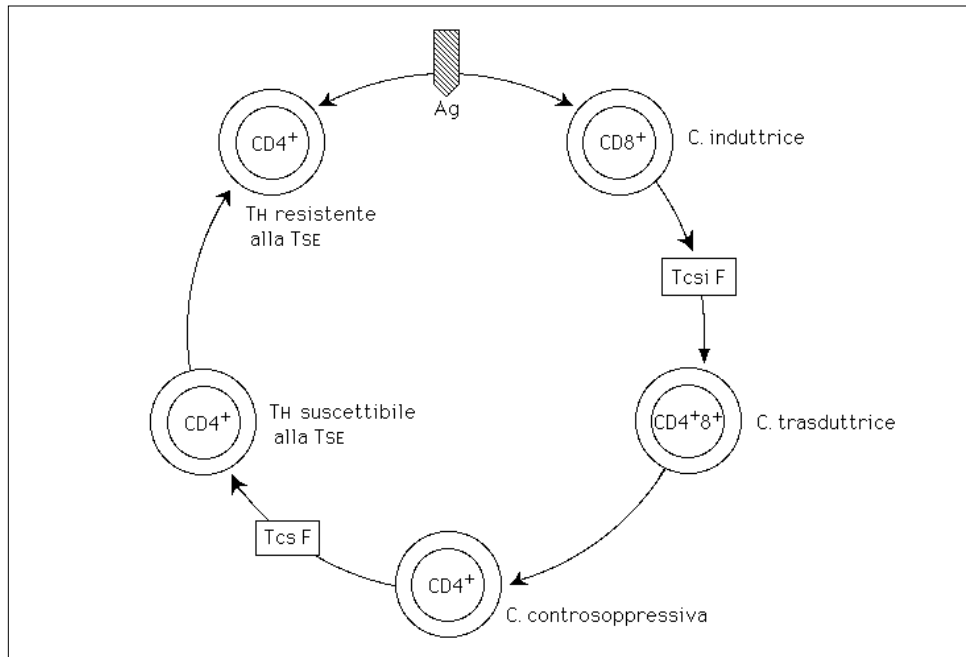


Figura 16. Modello schematico del meccanismo della controsoppressione antigene-indotta. Ag = antigene; TcsiF = fattore T induttore della controsoppressione; TcsF = fattore T controsoppressivo; TSE= cellula T effettrice della soppressione.

5. Funzioni delle Cellule T con Recettori

Le attività che svolgono i linfociti T con recettori TCR-1 non sono ancora completamente conosciute, così come il ruolo biologico a cui essi assolvono. In generale si ritiene che le cellule con TCR-1 abbiano attività citotossica non-MHC ristretta e che siano in grado di rispondere a molecole MHC allogene di classe I. Esse sono in realtà specifiche per prodotti genici autologhi MHC-like di classe I poco polimorfici e cross-reagiscono con più debole affinità con prodotti polimorfici convenzionali di classe I (Raulet 1989; Janeway e al. 1988). E' stato recentemente precisato che le molecole CD1 sono ligandi dei recettori TCR-1. Alcune osservazioni sembrano però indicare che un numero molto limitato di tali cellule possa riconoscere degli antigeni estranei in associazione con molecole MHC di classe I (Matis e al. 1987).

Questa conclusione concorda del resto con alcuni risultati ottenuti con cloni T cellulari citotossici TCR-1 positivi ed in esperimenti di MLR. Sembra possibile che i linfociti T con TCR-1 siano capaci di modificare la specificità della catena β sotto attivazione, distinguendosi in questo nettamente dai linfociti T con TCR-2, come pure dai linfociti B, che non hanno questa opzione. In effetti la catena β delle cellule rispondenti in MLR, e quindi attivate, è del tipo V2J2C2 sia a livello di mRNA che di prodotto genico, mentre la catena β di cellule non attivate, come cellule di timo fetale, timociti adulti e cellule spleniche adulte doppio negative ($CD4^-CD8^-$), cellule spleniche nude e cellule T dell'epidermide, è del tipo V4J1C1. Ma questo problema necessita di ulteriori indagini specialmente sull'uomo (Janeway e al. 1988).

Un altro punto attualmente soggetto a revisione riguarda il fatto che le cellule con TCR-1 abbiano attività esclusivamente citotossica. La produzione di linfocine da parte di queste cellule, segnalata in qualche lavoro, sembra giustificare qualche riserva.

La distribuzione delle cellule con TCR-1 nell'organismo è importante per capirne il ruolo biologico. Purtroppo però la grande maggioranza delle osservazioni riguarda il topo, mentre gli studi sull'uomo sono abbastanza limitati. Le cellule con TCR-1 sono rare nel sangue periferico e negli organi linfoidi periferici dell'uomo e del topo normali. Si trovano però in percentuali del 20%-50% dei linfociti T totali periferici nell'agnello, nella pecora, nel pollo e nel maiale. Sono invece predominanti nelle popolazioni linfocitarie isolate dagli epiteli di topo (Raulet 1989; Janeway e al. 1988).

Sembrirebbe quindi che nel topo normale le cellule T TCR-1 positive siano nell'insieme dell'organismo più numerose delle cellule T TCR-2 positive, benchè rappresentino solamente l'1-2% dei linfociti T totali del sangue e degli organi linfoidi. Questa abbondanza di cellule T TCR-1 positive negli epiteli, che suggerisce nel topo un loro ruolo preminente nella difesa immunologica a livello degli epiteli e delle mucose, forse analogo a quello svolto dalle IgA nella difesa umorale, non è stata però dimostrata nell'uomo, dove la funzione biologica di queste cellule resta da chiarire. Anche nell'uomo in condizioni normali le cellule T con recettore α rappresentano l'1-2% delle cellule del sangue periferico, e la grande maggioranza si trovano negli epiteli, specialmente della cute, del tratto gastro-intestinale, dei polmoni e dell'apparato riproduttivo femmi-

nile. Tuttavia, nell'uomo solamente il 10% circa delle cellule T intestinali intraepiteliali esprime TCR $\alpha\beta$. Le cellule T con TCR $\alpha\beta$ dell'epitelio utilizzano in maggioranza il segmento genico V 1, mentre quelle del sangue usano il segmento V 2. Le cellule T umane con TCR $\alpha\beta$ V 2 sono inizialmente assenti nel timo, mentre le cellule T esprimenti V 1 sono emigranti timici e rappresentano la maggioranza dei timociti TCR $\alpha\beta$. Studi recenti indicano che le due forme principali di TCR $\alpha\beta$ con struttura molecolare V 2 o V 1, riconoscibili da moAb specifici corrispondono alle due forme polimorfiche precedentemente indicate e caratterizzate dalla presenza oppure no di un ponte disolfuro tra le catene α e β . In condizioni patologiche i linfociti T $\alpha\beta$ aumentano nettamente di numero in malattie caratterizzate da infiammazione cronica e da lesioni granulomatose, come l'artrite reumatoide, le lesioni da micobatteri della cute e dell'albero respiratorio, la sarcoidosi polmonare e la sclerosi multipla, e in alcune affezioni acute come le polmoniti virali. Il significato di questo comportamento resta da chiarire.

E' stato suggerito che la funzione dei linfociti con TCR-1 potrebbe essere quella di sorvegliare sull'integrità degli epitelii, distruggendo le cellule epiteliali alterate. Sembra deporre in questo senso il fatto che i linfociti T $\alpha\beta$ circolanti siano spesso effettori citotossici costitutivamente attivati, e che siano dotati di reattività nei confronti di target self e in particolare di proteine self hsp 60-70. Queste come è noto sono proteine largamente diffuse nelle cellule dalle quali vengono liberate in caso di stress o di danno. Pertanto potrebbero rappresentare i target dell'azione citotossica dei linfociti T $\alpha\beta$ nei confronti di cellule epiteliali alterate o danneggiate e comunque da eliminare. Questa self reattività potrebbe però in determinate circostanze coinvolgere i linfociti T $\alpha\beta$ in fenomeni di autoaggressione e di malattie autoimmuni (Doherty, 1991).

Considerata la variabilità relativamente bassa degli eterodimeri $\alpha\beta$, i linfociti con TCR-1 devono disporre di un repertorio di riconoscimento limitato rispetto a quello dei linfociti con TCR-2 che riconoscono, con alta specificità, antigeni estranei presentati dal MHC self. Poichè i linfociti con TCR-1, come abbiamo già detto, possono essere attivati da molecole MHC-like di classe I moderatamente polimorfiche in un determinato locus, ma significativamente diversificate nei diversi loci, è stato proposto che queste molecole, codificate in loci diversi da quelli dei comuni prodotti MHC di classe I, siano il normale bersaglio dei linfociti con TCR-1 (Janeway e al. 1988).

Infezioni o trasformazioni neoplastiche o di altra natura indurrebbero l'espressione di tali molecole sulla membrana di cellule epiteliali (e forse di altre cellule) determinando l'attivazione di linfociti con TCR-1 e la distruzione non-MHC ristretta delle cellule alterate. Ma tutto questo necessita di precise verifiche nell'uomo. E' stato recentemente suggerito che i linfociti con TCR-1 siano deputati alla difesa contro i micobatteri (Raulet 1989).

6. Distribuzione dei Linfociti T negli Organi Linfoidi Periferici

I linfociti T maturi vergini CD4⁺ o CD8⁺ lasciano il timo attraverso le venule post-capillari della midollare e si localizzano, grazie a recettori di adesione, negli organi linfoidi periferici dove la presentazione degli antigeni da parte delle cellule interdigitate ne induce l'attivazione, l'amplificazione clonale e la produzione di un subset di linfociti T effettori e di un secondo subset di linfociti T memoria a vita molto lunga (20 anni) e ricircolanti. Negli organi linfoidi periferici i linfociti T si localizzano nelle aree timo-dipendenti e specialmente nella zona paracorticale dei linfonodi e nelle guaine periarteriolari spleniche.

Nelle zone paracorticali dei linfonodi si accumulano intorno alle cellule interdigitate cellule CD4⁺ e CD8⁺ con un rapporto di 2:1. Invece nei centri germinativi dei follicoli linfatici si trovano pochi linfociti T (<5%) unicamente di fenotipo CD4⁺ e CD57⁺ (vedi anche Parte prima, cap. 4).

7. Altri Recettori di Superficie dei Linfociti T

Diversi altri antigeni con capacità recettoriale possono essere dimostrati sui linfociti T. Alcuni di essi sono caratteristici, anche se non esclusivi delle cellule T, come il CD2, il CD7 e il CD28, mentre altri sono normalmente espressi anche in cellule non T, come il CD11b e il CD71.

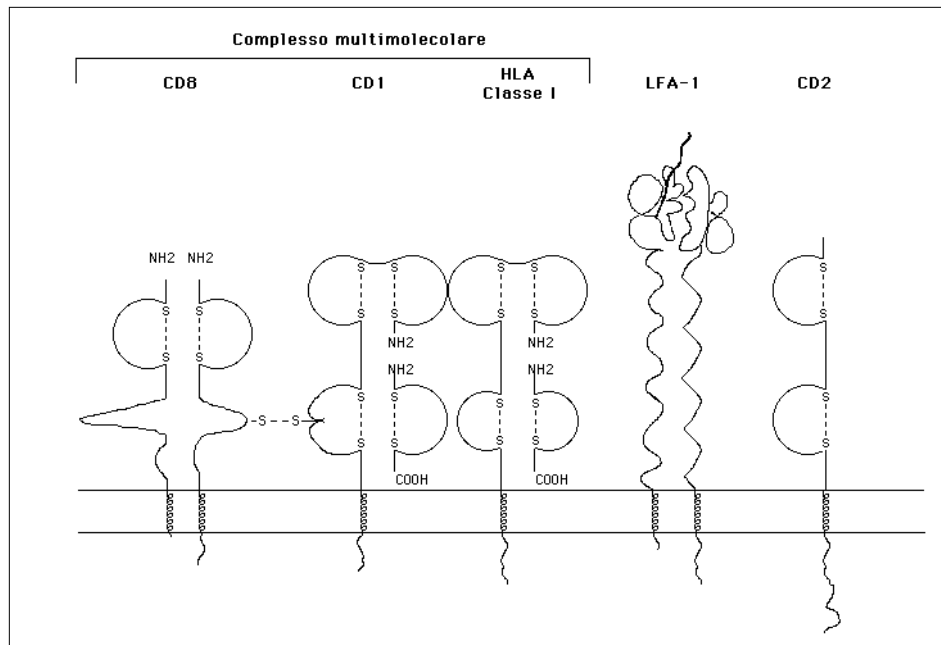


Figura 17. Struttura schematica di alcune molecole di membrana coinvolte nelle funzioni dei linfociti T (v. testo).

7.1. L'antigene CD1

Sotto la denominazione di CD1 è raggruppata una famiglia di antigeni di membrana normalmente espressi sui timociti immaturi (corticali) che hanno caratteristiche strutturali e probabilmente funzionali simili a quelle degli antigeni HLA di classe I. La molecola è infatti una glicoproteina dimerica composta da una catena di 43-49 kD, analoga alla catena pesante delle molecole HLA di classe I, legata in modo non covalente con una α 2-microglobulina (α 2-m.) (Blue e al. 1988a; De la Hera e al. 1988). La catena pesante è strutturata, dall'estremità COOH⁻ a quella NH₂, in una porzione intracitoplasmatica, un segmento transmembrana, e tre domini variabili denominati 1, 2 e 3. Il dominio 3 è coinvolto nel legame sulfidrilico con l'antigene CD8, mentre il dominio 1 è legato in modo non covalente con la α 2-m. Questo legame è piuttosto debole per cui la α 2-m può

facilmente dissociarsi ed essere sostituita a temperature fisiologiche da una β -2-m esogena. Le molecole CD1 sono considerate antigeni MHC-like di classe I, e da alcuni sono state viste come la controparte umana degli antigeni murini TL. Originariamente l'antigene CD1, riconosciuto prima dall'anticorpo HTA1, era ritenuto un unico marker. La disponibilità di anticorpi monoclonali specifici ha permesso di distinguere tre varianti antigeniche CD1 denominate CD1a, CD1b e CD1c, tutte espresse normalmente su timociti immaturi. Il CD1a, con un p.m. di 49 kD, è riconosciuto dagli anticorpi OKT6, Leu6, NA-1/34, T6 e BMA060. Il CD1b, di 47 kD, è riconosciuto dagli anticorpi M-241 e NUT-2. Il CD1c, di 43 kD è riconosciuto dall'anticorpo L161. I tre tipi di CD1 possono essere coespressi su una singola cellula, e due dimeri CD1 possono associarsi fra loro in modo non covalente sulla membrana in un complesso tetramolecolare. L'antigene CD1a è presente nel 60-90% dei timociti umani, nelle cellule di alcune leucemie e di linfomi T, in cellule di Langerhans della cute, in cellule interditate e dendritiche follicolari delle tonsille, dei linfonodi e della milza, e in cellule del Purkinje del cervelletto. E' stato anche dimostrato in piccole percentuali di linfociti del sangue del cordone ombelicale, e in quote trascurabili di linfociti periferici di adulti sani. E' il ligando naturale del TCR β . La molecola CD1b è espressa sui timociti corticali, sulle cellule dendritiche dei linfonodi ma non sulle cellule della cute. La molecola CD1c è espressa, oltretutto sui timociti corticali, sulle cellule B del mantello, su un piccolo numero di cellule B del sangue periferico (Small e al. 1987), su cellule dendritiche del linfonodo e su cellule dendritiche del derma e di altri tessuti corticali.

Recenti studi di genetica molecolare hanno permesso di isolare da una library genomica umana 5 distinti geni tutti codificati nel cromosoma 1 (Martin e al. 1986).

Tali geni potenzialmente codificano per 5 diverse proteine generalmente indicate come CD1a, b, c, d ed e. Le prime tre come è stato già detto sono espresse a livello proteico e sono definibili serologicamente. Questo suggerisce che il numero di varianti molecolari che compongono la famiglia del CD1 è superiore a quello finora trovato. Tutti i 5 geni hanno una sequenza polinucleotidica per il dominio β 3 altamente conservata, ed il grado di omologia delle sequenze aminoacidiche in questo dominio tra un CD1 e l'altro è del 71-88%. Invece l'omologia tra CD1 e HLA di classe I al dominio β 3 è solo del 21%, che è dello stesso grado dell'omologia esistente tra ciascuno di questi due domini β 3 e il dominio β 2 delle molecole HLA di classe II. In base alle divergenze tra le molecole CD1 e le molecole MHC è stato suggerito che i geni CD1 derivino da un precursore MHC di classe II, dopo che questo si è separato dall'MHC di classe I, ma prima che perdesse la sua associazione con la β -2-m. Il numero di linfociti CD1a positivi è massimo nella corticale timica e diminuisce a livello della midollare. Il CD1a che è un antigene precoce nella differenziazione dei linfociti e generalmente confinato alla corteccia, è stato trovato anche in pazienti con età superiore a 60 anni, e questo sta ad indicare che i precursori immaturi sono presenti nel timo per tutto l'arco della vita.

Altri studi compiuti marcando i linfociti con anticorpi diretti contro la TdT (antigene presente su cellule staminali) hanno confermato questa ipotesi. Si può pertanto concludere che il timo dell'adulto e quello dell'anziano continuano ad accogliere precursori pre-timici di linfociti T dal midollo osseo, provvedendo così a generare cloni T cellulari per tutta la durata della vita. Sul piano funzionale, accanto al ruolo di trasduttore di segnali accessori nel processo di riconoscimento, e di stabilizzatore della molecola CD8

sulla membrana, già precisati nel paragrafo 3.4, la molecola CD1 è possibile che funga anche da presentatore di antigeni, e che sia coinvolto nella differenziazione dei linfociti T e nella selezione del repertorio dei TCR.

7.2. L'antigene CD2

E' espresso in tutti i linfociti T periferici, nel 95% dei timociti e nella maggior parte delle cellule NK. E' un membro della superfamiglia delle Ig, ed è strutturato in due domini globulari extracellulari seguiti da una regione idrofobica transmembrana e da un segmento citoplasmatico di 116 aa., essenziale per la trasmissione del segnale di attivazione. Nell'uomo è il primo antigene che viene acquisito nell'ambiente timico (Allison e Lanier 1987; Marrack e Kappler 1988; Strominger 1989). Si tratta di una glicoproteina di 50 kD nella quale specifici anticorpi monoclonali hanno consentito il riconoscimento di tre diversi epitopi denominati 1, 2 e 3 (Vienna 1989; Hansel 1987; Shaw 1987; Zambello e al. 1987).

L'epitopo CD2₁ è il recettore per le emazie di pecora (E), comunemente sfruttato nel test delle rosette E per la differenziazione, la numerazione e la separazione dei linfociti T. L'epitopo CD2₂ non è implicato nel legame con le emazie di pecora, ma ha la stessa distribuzione cellulare del recettore CD2₁. Questi due epitopi sono presenti normalmente nella molecola CD2 mentre l'epitopo CD2₃ è presente solo nella molecola CD2 espressa nelle cellule attivate. Quest'ultimo epitopo, che caratterizza evidentemente una diversa molecola CD2, attualmente denominata CD2R (Vienna 1989), è riconosciuto dagli anticorpi monoclonali T11-3, 9-1, VIT13. Sono stati prodotti numerosi anticorpi monoclonali anti-CD2, tra i quali T030, T081, T082, T083, T092, T198 e T203. Ma quelli più comunemente adoperati sono OKT11, T11, Leu5, 9.6. Alcuni anticorpi monoclonali specifici per gli epitopi CD2₁ e CD2₂, legandosi alla molecola CD2 inducono attivazione e proliferazione cellulare attraverso un aumento della concentrazione dei Ca⁺⁺ intracitoplasmatici, l'espressione dell'IL-2R, e la produzione di IL-2, mentre altri anticorpi anti-CD2 causano inibizione sulla proliferazione cellulare. La molecola CD2 ha comunque un ruolo importante nell'attivazione sia delle cellule T che delle cellule NK. Il fatto che nell'ontogenesi delle cellule T l'espressione dell'antigene CD2 preceda quella dell'antigene CD3 ha fatto ipotizzare che il CD2 rappresenti una via ancestrale di attivazione dei linfociti T. La situazione sembra però più complessa come indicano i risultati ottenuti (Moretta e al. 1987) in mutanti di cellule Yurkat con perdita selettiva di antigeni di membrana.

In assenza di CD2 anche le funzioni del CD3/TCR e del CD28 sono perdute, e in assenza del CD28 è perduta la funzione del CD3/TCR, ma non quella del CD2 (Feldman 1988). Questo sembrerebbe dimostrare che la molecola CD2 è indispensabile sia per l'attivazione della cellula avviata dal segnale di riconoscimento dell'antigene da parte del complesso CD3/TCR, sia per l'attivazione indotta attraverso stimolazione del CD28. Ma la situazione in vivo su cellule normali sembra essere diversa, e il ruolo funzionale del recettore CD2 alquanto più vasto. La molecola CD2 è già espressa nei pre-timociti nella corticale timica e si mantiene successivamente in tutte le fasi maturative delle cellule T, suggerendo un suo ruolo non solo nel processo di attivazione cellulare, sia CD3/TCR indotto che CD3/TCR indipendente (stimolazione di linfociti T con antigeni

T-indipendenti, mitogeni o moAb anti-CD2, attivazione di cellule NK e di timociti CD3), ma anche nella proliferazione delle cellule T attraverso il ciclo cellulare, e nel processo maturativo dei timociti (Strominger 1989; Marrack e Kappler 1988) grazie al suo ruolo fondamentale di molecola di adesione. Il ligando naturale del recettore CD2 è la molecola LFA-3 (o CD58) che è una glicoproteina di membrana ubiquitaria, presente in tutte le cellule e particolarmente nelle cellule dell'epitelio timico. L'adesione del timocita alla cellula epiteliale intratimica, mediata dal contatto CD2-LFA-3, è indispensabile per la selezione del repertorio T cellulare. L'interazione tra CD2 e LFA-3 (analogamente all'interazione tra IL-2R e IL-2) sembra dar luogo a segnali che inducono proliferazione e sviluppo dei timociti triplo negativi (CD3⁻CD4⁻CD8⁻). Fattori LFA-3 simili potrebbero operare in modo analogo sui linfociti T maturi inducendone la progressione nel ciclo cellulare e la proliferazione.

7.3. L'antigene CD7

Marcatore precocissimo, è apparentemente il primo recettore di membrana espresso nelle cellule della linea T, già nello stadio di pro-timocita (nel sacco vitellino, nel fegato fetale e nel midollo osseo). La sua funzione in questo stadio della maturazione sembra essere quella di recettore di riconoscimento per l'homing nel timo fetale dei protimociti che, come abbiamo già ricordato, avviene nell'uomo a 8-9 settimane (Strominger 1989).

Dopo la colonizzazione nella corticale timica, le cellule T mantengono l'espressione del CD7 per tutta la differenziazione fino alle fasi più mature. Si tratta di una molecola di 40 kD presente nella grande maggioranza dei linfociti T del sangue periferico (Hansel 1987; Shaw 1987; Zambello e al. 1987).

Fra questi, è dimostrabile in tutti i linfociti CD8⁺ e nel 90% circa dei linfociti CD4⁺. E' inoltre espresso nella maggior parte delle cellule NK, nei timociti della corticale e della midollare, e nelle cellule di alcune malattie linfoproliferative T, come ALL-T, CLL-T, linfomi non Hodgkin T, ma non nelle cellule delle ALL-comuni, ALL-nulle, ALL-B, CLL-B e linfomi non Hodgkin B. Il CD7 rappresenta infatti uno dei marcatori di linea T più utili per la diagnosi delle leucemie linfoblastiche acute, in quanto definisce uno stadio che precede l'espressione sia del CD3 che del CD2. Tuttavia recentemente è stato osservato che anticorpi monoclonali anti-CD7 possono reagire anche con una piccola percentuale di cellule di leucemie mieloblastiche, suggerendo l'esistenza di un precursore comune. E' stato dimostrato che il CD7 è il recettore per il frammento cristallizzabile delle IgM o Fc μ R, ma il suo ruolo funzionale non è ancora chiarito. E' riconosciuto dagli anticorpi monoclonali 3A1, Leu9, 4H9, 4A, WT1, OKT16.

7.4. L'antigene CD28

Tra i recettori di membrana delle cellule T coinvolti nella loro attivazione deve essere ricordato il CD28. Si tratta di una glicoproteina di 80-90 kD strutturata in omodimero, precedentemente denominata 9.3. Fa parte della superfamiglia delle Ig per la presenza di un dominio Ig-like nella sua porzione extracellulare. E' dimostrabile nel 40% circa dei timociti e nel 75% circa dei linfociti T periferici, compresi quelli che rispondono ai mitogeni solubili, ma non in cellule non-T (Hansel 1987; Shaw 1987; Zambello e al. 1987).

Il CD28 compare nell'ontogenesi delle cellule T a livello dei timociti midollari con fenotipi $CD3^+TCR^+CD4^+CD8^-$ o $CD3^+TCR^+CD4^-CD8^+$, e l'acquisizione del CD28 sembra essere indispensabile per la maturazione delle cellule che esprimono il TCR-2 (Moretta e al 1987). Anche la funzione del complesso CD3/TCR sembra essere condizionata dalla presenza sulla membrana delle cellule T del recettore CD28, come suggerisce il fatto che cellule Jurkat mutanti che possiedono il complesso CD3/TCR, ma non la molecola CD28, non sono attivate da anticorpi anti-CD3. D'altra parte anticorpi monoclonali anti-CD28 possono agire sinergicamente con stimoli operanti sul complesso TCR/CD3 nell'indurre i linfociti T che esprimono CD28 a produrre citochine e a proliferare. Il CD28 sembra essere pertanto, accanto al CD2 e al CD25, un altro recettore importante nel processo di attivazione e di proliferazione delle cellule T con TCR-2 (Feldman 1988). Il CD28 è espresso in tutte le cellule T $CD4^+$ e nel 50% delle cellule T $CD8^+$. La sua coespressione con l'antigene CD8 caratterizza i linfociti T ad alta attività citotossica. L'anticorpo monoclonale di uso più comune per il suo riconoscimento è l'anti-9.3. Recentemente è stato dimostrato che l'antigene B7 espresso sui linfociti B è un ligando di CD28, e che questo recettore svolge un ruolo importante nella proliferazione dei B linfociti.

7.5. L'antigene LFA-1

È un componente della subfamiglia 2 delle integrine strutturato in eterodimero di 275 kD. La catena α è rappresentata dalla molecola CD11a e la catena β dalla molecola CD18.

La prima ha un p.m. di 180 kD ed è composta da 1063 aa., con 12 siti di N-glicosilazione, organizzati in una sequenza citoplasmatica C-terminale di 53 aa., in una sequenza transmembrana, e in una lunga sequenza extracellulare N-terminale (v. fig. 17).

Questa contiene 7 tandem repeats omologhi di 60 aa. ciascuno, presenti anche nelle catene β di altre subfamiglie delle integrine. Queste sequenze in tandem contengono un nonamero di consenso per il legame dei cationi divalenti, essenziali per la formazione, la stabilizzazione e la funzione dell'eterodimero LFA-1. Tra il secondo e il terzo repeats è intercalato un lungo dominio di 187 aa., assente in tutte le altre integrine eccetto il recettore VLA-2, denominato dominio-A.

Questo dominio ha un'alta omologia con un dominio conservato, ripetuto una o più volte, in diverse proteine con proprietà adesive, come il fattore di von Willebrand (i repeats omologhi sono coinvolti nel legame al collagene, all'eparina e al fattore piastrinico Ib) e i fattori C2 e Bf del complemento (i repeats omologhi si trovano nei frammenti C2a e Bb che hanno siti di legame metallo-dipendenti per C4b e C3b rispettivamente). Questi dati suggeriscono che il dominio-A della catena CD11a può essere responsabile delle funzioni adesive cellula-cellula e cellula-matrice del recettore LFA-1. La regione transmembrana, altamente conservata nelle molecole CD11a, b, e c, e in varie altre integrine, sembra avere un ruolo critico nella stabilizzazione del dimero $\alpha\beta$ e nell'interazione con i lipidi della membrana. Infine la regione citoplasmatica, che

contiene diverse serine e treonine, è un trasduttore di segnali potenzialmente esposto a fosforilazione.

La molecola CD18 è una glicoproteina transmembrana di 95 kD e 678 aa. con 6 siti di N-glicosilazione, codificata nel braccio lungo del cromosoma 21. È strutturata in una regione citoplasmatica di 46 aa., altamente conservata, che contiene vari aa. (tirosina e diverse serine e treonine) che possono essere fosforilati in seguito a stimolazione. Anche la regione transmembrana è altamente conservata e può avere funzioni simili a quelle della analoga regione della catena β . La porzione extracellulare è organizzata in una regione ricca di cisteina (CRR) altamente conservata composta da 4 tandem repeats contenenti 8 cisteine ciascuno, e in una regione N-terminale di 247 aa. anch'essa altamente conservata. Questa regione è essenziale per l'interazione con il ligando e per la formazione dell'eterodimero. La comparsa di mutazioni in questa regione altera l'espressione del CD18 sulla membrana cellulare.

Le funzioni principali mediate dall'intera molecola LFA-1 sono quelle di favorire: l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T indotta da antigeni, alloantigeni e mitogeni; la citotossicità dei linfociti NK, K e CTL; l'aggregazione dei linfociti T e B; la produzione di Ig T helper-indotta; l'adesione dei linfociti alle HEV e l'interazione tra cellule T-T, T-APC.

La molecola LFA-1 ha un'espressione aumentata nei linfociti T memoria, insieme a diverse altre molecole di adesione come CD2, CD58, CD44, CD29 e CD54.

7.6. L'antigene CD44

Si tratta di una molecola di adesione, denominata anche Hermes o PGP-1, con funzioni di homing receptor. È una glicoproteina transmembrana che può presentarsi in forme differenti e in differenti cellule. Una forma di 90 kD, con una sequenza "core" centrale di 37 kD fortemente glicosilata è la forma emopoietica o standard. È presente in prevalenza nei leucociti circolanti, nelle cellule del midollo osseo, comprese le cellule emigranti dal midollo osseo, nei linfociti T e B, nei granulociti, macrofagi, fibroblasti ed eritrociti. Questa può svolgere un ruolo importante nella migrazione dei precursori T verso il timo. Delle varianti proteoglicaniche di 140-200 kD sono presenti in altre cellule. La più comune di queste è una glicoproteina di 180 kD, fortemente glicosilata nel dominio prossimale extracellulare, contenente 135 aa. dimostrabile principalmente in cellule epiteliali. Le due varianti di 90 e di 180 kD si trovano entrambe in numerosi tipi di cellule normali. Altre 32 varianti del CD44 sono state trovate in cellule tumorali e sembrano essere dei markers specifici e precoci dell'oncogenesi tanto che la loro determinazione è stata ritenuta utile per scopi diagnostici (Matsumura e coll. 1992).

La ragione della grande variabilità di questa glicoproteina risiede nel fatto che il gene CD44 contiene 5 esoni che possono essere trascritti in combinazioni diverse dando luogo a differenti sequenze di mRNA. Queste possono inserirsi alternativamente nella sequenza standard di base del mRNA (v. fig. 18).

Ciascuna cellula può così contenere due o più varianti di mRNA CD44 e quindi esprimere sulla membrana due o più varianti della molecola.

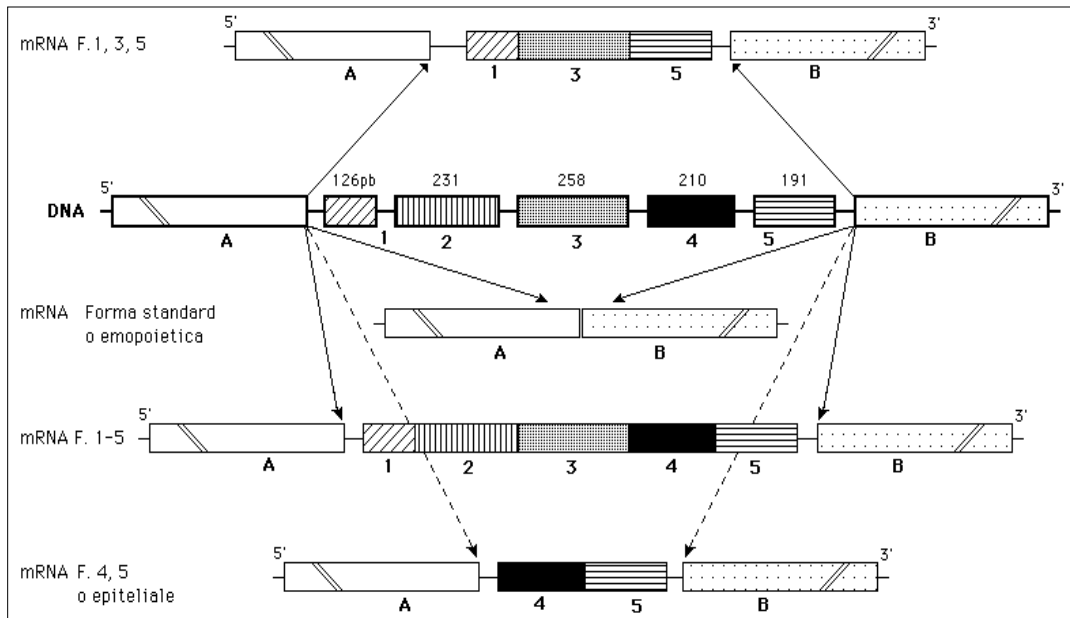


Figura 18. Struttura schematica del gene CD44 con alcuni esempi delle possibili forme varianti di mRNA dovute a splicing alternativi dei trascritti degli esoni 1, 2, 3, 4 e 5. Le dimensioni dei 5 esoni sono date in numero di paia di basi (pb) e sono proporzionali a quelle reali, mentre quelle dei segmenti A (5') e B (3') sono solo indicative (vedi testo) F.= forma.

7.7. Altri recettori

Altri due recettori di membrana espressi nelle cellule T in uno stadio molto precoce dell'ontogenesi (pre-timocita) e implicati nei processi di maturazione, di proliferazione e di modulazione dell'attività delle cellule T sono il CD5 e il CD25.

Il CD5 è presente in tutti gli stadi maturativi della cellula T, dal pre-timocita al timocita corticale triplo negativo (CD3⁻CD4⁻CD8⁻ CD1⁺CD2⁺CD7⁺CD25⁺), fino al linfocita maturo (Strominger 1989). Tutte le cellule CD3⁺CD4⁻CD8⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁻CD8⁺, sia che esprimano il recettore TCR-1 che il recettore TCR-2, sono CD5⁺. Sembra chiaro che il possesso dell'antigene CD5 è un requisito importante per la maturazione dei timociti, benchè non se ne conosca il meccanismo. D'altra parte le osservazioni condotte su topini omozigoti per il gene *lpr* (gene di linfoproliferazione), caratterizzati da una massiva linfoaccumulazione negli organi linfoidi periferici da parte dei linfociti T CD5⁺CD4⁻CD8⁻ che esprimono livelli molto bassi di CD3 e di TCR (e non presentano riarrangiamento dei geni Ig) prova che altri fattori, insieme al CD5, sono in gioco nel processo maturativo delle cellule T (Strominger 1989). Anticorpi monoclonali anti-CD5 inducono attivazione e proliferazione dei linfociti T, potenziano l'attivazione e la proliferazione CD3 indotta, e accrescono la produzione dei mediatori attivi sulla proliferazione e la differenziazione dei B linfociti. La recente individuazione nel sangue periferico di individui normali di un piccolo subset (7-8% del totale) di

linfociti T CD2⁺CD3⁺CD5⁻ potrà contribuire a chiarire il ruolo funzionale dell'antigene CD5 nei linfociti T maturi (Srouf e al. 1988). Queste cellule hanno minore attività proliferativa e più spiccata attività citotossica dei linfociti CD2⁺CD3⁺CD5⁺. Sono inoltre tutte virtualmente CD4⁻ e circa 1/3 di esse è CD8⁺. Il 75% circa delle cellule appartenenti a questo subset è CD16⁻CD57⁻, e il restante 25% è CD16⁻CD57⁺. Dopo deplezione con moAb anti-CD5 e complemento residua nel midollo osseo l'1% o meno di cellule T CD3⁺CD5⁻, e i pazienti trapiantati con questo midollo possono ancora presentare GVHD (Srouf e al. 1988). Sembra dunque che l'attività T citotossica-soppressiva sia in parte appannaggio delle cellule T CD5⁻. E' possibile anche che, analogamente a quanto visto nel topo, cellule T CD5⁺ siano deputate alla modulazione dell'effetto delle cellule T soppressive sulle cellule T helper-inducer, e che si comportino come le cellule "controsoppressive" evidenziate nel topo, realizzando un circuito di regolazione della risposta T linfocitaria simile a quello già dimostrato per i linfociti B CD5⁺ nella risposta anticorpale. Altre osservazioni sembrano invece indicare che le cellule CD3⁺CD5⁺ siano quelle maggiormente responsabili di GVHD nei trapianti di midollo osseo. Anche il CD25 (recettore della IL-2 a bassa affinità o TAC) è acquisito dalle cellule T molto precocemente ed è espresso sulla membrana dei pre-timociti CD7⁺ insieme ai recettori CD1, CD2, e CD5. Il suo ruolo nella maturazione e proliferazione dei timociti triplo-negativi è parallelo a quello del CD2 e come questo dipendente dall'interazione con il ligando specifico (CD2-LFA-3 o CD58; CD25-IL-2) (Strominger 1989).

Nel linfocita T maturo a riposo il CD25 non è espresso. Questa cellula esprime invece IL-6R sul quale agisce l'IL-6 che induce l'espressione sulla membrana del CD25. L'attivazione del linfocita T, che si traduce sempre nell'espressione del dimero CD25 (Smith 1987), è generalmente dovuta al legame del TCR con un peptide estraneo presentato da una cellula APC mediante una molecola HLA self e alla successiva trasmissione del segnale all'interno della cellula da parte del complesso CD3/CD4 o CD3/CD8. Il legame del TCR con l'antigene estraneo al di fuori della fisiologica presentazione da parte delle molecole HLA self sembra invece non indurre l'espressione del CD25 e tradursi in una tolleranza immunitaria. L'espressione del CD25 può essere causata nei linfociti T anche da mitogeni (Feldman 1988).

I linfociti T attivati dalla PHA esprimono l'IL-2R ma perdono l'IL-6R e quindi la capacità di rispondere all'IL-6 la cui produzione è stimolata nei fibroblasti, monociti, cellule endoteliali da fattori endogeni come IL-1, TNF α e da fattori esogeni come virus, mitogeni, etc. L'espressione del recettore CD25 sulle cellule T attivate da un antigene è sempre transitoria e cessa con la divisione cellulare. Il gene codificante per la catena del CD25 è portato sul cromosoma 10 ed è strutturato in 8 esoni di cui due non tradotti agli estremi 5' e 3', cinque codificanti per i 221 aminoacidi extramembrana e uno (il settimo) codificante per i 30 aminoacidi transmembrana e intracitoplasmatici. Il gene della catena non è stato ancora clonato (Male e al. 1988).

Per il CD25 vedi anche pagina 82.

L'antigene CD11b corrispondente al recettore per il C3bi della frazione C3 del complemento è espresso in più del 30% di linfociti del sangue periferico comprese la maggior parte delle cellule NK e un subset di linfociti T. E' anche presente nei neutrofili, negli eosinofili e nei monociti. L'antigene CD11b svolge un ruolo importante nel

meccanismo di adesione cellulare dei linfociti T e nella clearance degli immunocomplessi solubili. Le caratteristiche principali di questo antigene sono riportate alle pagine 81-82.

L'antigene **CD71**, precedentemente denominato T9, è il recettore per la transferrina. Glicoproteina omodimerica costituita da due catene identiche di 94 kD ciascuna, è espressa sul pro-timocita e sul timocita corticale immaturo (pre-timocita), e scompare a livello del timocita corticale comune quando compaiono gli antigeni CD4 e CD8. L'antigene CD71 è espresso anche su linfociti B immaturi, su blasti T e B, su cellule di leucemie acute linfatiche e non linfatiche. Non è dimostrabile normalmente nei timociti maturi e nei linfociti T periferici. E' invece presente in un gran numero di linee cellulari ottenute da cellule leucemiche o di linfoma, come K562, KG1, HL60, MT1, Molt-4 e Jurkat. E' riconosciuto dall'anticorpo monoclonale OKT9 e da numerosi altri moAb.

L'antigene **CD6**, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale T12, è una glicoproteina di 120 kD dimostrabile su tutti i linfociti T e su un piccolo subset di B linfociti. Il suo ruolo funzionale non è conosciuto. L'antigene CD6 è acquisito dai timociti nella midollare timica quando essi perdono il CD1. E' stato ipotizzato che l'acquisizione del CD6 da parte del timocita midollare segni la transizione della cellula da timocita maturo (CD7⁺, CD1⁺, CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD4⁺, CD8⁻ o CD4⁻, CD8⁺) a linfocita immunocompetente (CD7⁺, CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD6⁺, CD4⁺, CD8⁻ o CD4⁻, CD8⁺), e che l'acquisita immunocompetenza connessa con l'espressione del CD6 non possa estrinsecarsi funzionalmente fino a quando i linfociti T lasciano il timo e migrano in periferia perdendo l'antigene CD38.

Altri marcatori presenti su cellule T sono il **CD38**, glicoproteina di 45 kD espressa su timociti T immaturi, su linfociti pre-B, plasmacellule e su NK, T e B attivati, sulla maggior parte dei linfociti T CD8⁺ del bambino e sui linfociti T CD8⁺ DR⁺ attivati in corso di infezione da HIV-1; il **CDw26** che è una glicoproteina di circa 130 kD espressa sui linfociti T attivati e riconosciuta dal moAb TS-145; il **CD27**, molecola di peso molecolare di circa 120 kD (in condizioni di non riduzione) espressa su linfociti T e su plasmacellule, è riconosciuta dall'anticorpo monoclonale OKT18a; il **CD43**, glicoproteina di 95 kD espressa oltrechè sui linfociti T, sui granulociti, sui globuli rossi e su cellule nervose; e l'antigene **CD30** che è un antigene nucleare denominato anche Ki-1, dimostrabile con l'anticorpo omonimo in linfociti T e B attivati (Hansel 1987; Shaw 1987; Vienna 1989). Un elenco dei principali cluster di differenziazione e dei relativi anticorpi monoclonali è dato nell'Appendice della Parte Terza.

8. Sottopopolazioni T Linfocitarie

I linfociti T, tutti definiti dall'espressione sulla membrana del complesso CD3, possono essere distinti in due gruppi principali in base al tipo di recettore che possiedono per il riconoscimento degli antigeni. Il primo gruppo, caratterizzato dal recettore TCR-1 o $\alpha\beta$, è identificato in base alla reattività delle cellule con anticorpi monoclonali specifici per una delle catene, come l'anticorpo TCS1 specifico per un sito della catena α . I linfociti con questo recettore rappresentano normalmente l'1-3% dei linfociti T totali del sangue periferico. Il secondo gruppo è caratterizzato dal recettore TCR-2 o $\alpha\beta$, è riconosciuto da anticorpi monoclonali specifici per un sito conformazionale del recettore, come l'anticorpo WT31, e rappresenta normalmente più del 97% dei linfociti T totali circolanti. Sul piano funzionale i linfociti con recettore TCR-1 sembrano essere deputati alla sorveglianza immunologica dell'integrità degli epiteli e appaiono specializzati nella eliminazione delle cellule autologhe danneggiate (infettate o trasformate) (Janeway e al. 1988; Raulet 1989). D'altra parte osservazioni recenti dimostrerebbero che queste cellule hanno un ruolo rilevante nella difesa immunitaria nei confronti dei micobatteri (Raulet 1989). Il particolare tropismo epiteliale di queste cellule, chiaramente evidenziato nel topo, e la loro attitudine funzionale, hanno suggerito che esse possano rappresentare nell'ambito dell'immunità cellulare il corrispondente delle IgA.

Il riconoscimento degli antigeni estranei da parte di queste cellule non ha in generale il requisito della restrizione HLA. E' interessante il fatto che nell'infezione da HIV questa categoria di linfociti T sembra essere nettamente aumentata. I linfociti con recettore TCR-2 sono responsabili della difesa immunitaria specifica nei confronti di tutti gli agenti estranei e particolarmente di quelli che, avendo superato la prima barriera difensiva a livello degli epiteli, esercitano la loro azione sulle strutture interne. I linfociti con TCR-2 dispongono, come è stato già precisato, di un repertorio di riconoscimento estremamente vasto che li rende atti a svolgere il ruolo di sorveglianza e di risposta immunitaria nei confronti della grande maggioranza degli agenti estranei. L'attività immunologica di queste cellule nei confronti degli antigeni non-self è rigorosamente HLA ristretta, sia nella fase di riconoscimento che nella fase effettrice.

Nell'ambito dei linfociti T con TCR-2 possono essere riconosciute due principali sottopopolazioni linfocitarie definite dall'espressione sulla membrana cellulare degli antigeni CD4 o CD8, e deputate a distinte attività funzionali (v. cap. 4).

I linfociti T CD4⁺ sono dotati di attività induttrice e rappresentano normalmente il 45±10% dei linfociti totali del sangue periferico. I linfociti T CD8⁺ appartengono invece alla categoria delle cellule T citotossiche-soppressive e rappresentano normalmente il 28±8% dei linfociti totali del sangue periferico. Due subsets distinti di linfociti CD3⁺CD4⁺ possono essere individuati grazie ad anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD29 e CD45RA. Il subset di cellule CD3⁺CD4⁺CD29⁺, precedentemente denominate 4B4, ha essenzialmente attività helper-inducer. Il subset di cellule CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺, precedentemente denominate 2H4, ha invece attività suppressor-inducer. In base alla struttura dell'antigene CD45R (v. fig. 6) si possono distinguere con specifici moAbs tre subsets T differenti (CD45RA, CD45RB, CD45RO) con differenti funzioni (v. cap. 3 e 4).

Per quanto riguarda i linfociti CD3⁺CD8⁺ la distinzione tra cellule con attività citotossica e cellule con attività soppressiva non è per ora possibile con sicurezza attraverso l'impiego di anticorpi monoclonali. In pratica non è stato ancora riconosciuto un antigene la cui coespressione caratterizzi un subset di linfociti T soppressivi, la cui esistenza viene attualmente persino messa in dubbio. Tuttavia in alcuni lavori (Modlin e al. 1987), è stato messo in evidenza come la coespressione dell'antigene CD11b si trovi essenzialmente nei linfociti T CD8⁺ ad attività soppressiva, mentre la coespressione dell'antigene CD28 caratterizzerebbe un subset con attività citotossica. E' stato già ricordato che sulla base della densità dell'antigene CD8 sulla membrana possono essere differenziati due tipi di linfociti T CD8⁺, uno ad alta densità CD8^{HD} e l'altro a densità intermedia CD8^{ID} (Arras e Contu 1989).

Mancano per ora studi funzionali su questi due subsets di cellule. Le sottopopolazioni di linfociti T definite sopra, possono trovarsi nel sangue periferico sia a riposo che in stato di attività. La coespressione di alcuni antigeni non specifici dei linfociti T può servire a distinguere queste due condizioni funzionali. In particolare la coespressione dell'antigene DR denota uno stato di attivazione sia dei linfociti T CD8⁺ che CD4⁺ indipendentemente dal fattore responsabile di tale attivazione. Le cellule T attivate, particolarmente in corso di infezione da HIV, esprimono in alta percentuale anche l'antigene CD57. E' stato osservato in questa condizione clinica che nelle cellule CD8⁺ l'antigene CD57 ha spesso una densità parallela a quella dell'antigene CD8. Cioè i linfociti T CD8⁺ attivati hanno alta densità di CD57 quando sono CD8^{HD}, intermedia densità di CD57 quando sono CD8^{ID}. I linfociti CD8^{LD} (CD3⁻CD16⁺) hanno invece bassa densità di CD57 (Arras e Contu 1989). Nella pratica, benchè la coespressione di numerosi altri marcatori di membrana possa essere studiata sui linfociti T per definire piccoli subsets di cellule, sembra proponibile uno schema di indagine che preveda:

1) la distinzione dei linfociti T in linfociti con TCR-1 o con TCR-2; 2) la distinzione dei linfociti T TCR-2 positivi in CD4⁺ o CD8⁺; 3) la determinazione dei due subsets CD4⁺CD29⁺CD45R⁻ e CD4⁺CD29⁻CD45RA⁺, rispettivamente T helper-inducer e suppressor-inducer; 4) la determinazione della percentuale di linfociti T CD4⁺ o CD8⁺ attivati, sulla base dell'espressione dei marcatori DR, CD25, CD57 e eventualmente gli altri sopraindicati; 5) la distinzione dei linfociti CD8⁺ nei subsets caratterizzati da differente densità dell'antigene e/o dalla coespressione dei recettori CD11b o CD28;

6) la determinazione del tradizionale rapporto CD4/CD8 e del più razionale rapporto tra cellule CD4⁺ e cellule CD8 ad alta e intermedia densità (veri T CD8); un esempio è riportato nella figura 7.

La coespressione del recettore CD25 è invece generalmente di natura immunologica e dovuta al legame del TCR- con un antigene estraneo presentato da una molecola HLA self. Anche altri fattori come per es. i mitogeni possono però indurre sulla membrana dei linfociti T l'espressione di questo recettore. La determinazione di altri antigeni come il CD38, il CD26 e il CD30 può essere utile per riconoscere lo stato di attivazione di queste cellule, il cui interesse è evidente nella pratica clinica.

I Linfociti NK

9. Caratteri Generali

Si tratta di una popolazione eterogenea di cellule linfoidi caratterizzate dalla capacità “naturale”, cioè non indotta preliminarmente da uno specifico antigene, di uccidere cellule infettate da virus e cellule neoplastiche. Sono perciò denominate cellule killer naturali o NK. Per il loro aspetto morfologico di grandi linfociti con numerosi granuli azzurrofilo citoplasmatici, queste cellule sono dette LGL (large granular lymphocytes), e per l'assenza sulla loro membrana dei recettori di riconoscimento specifici sia dei linfociti T (TCR) che dei linfociti B (sIg) sono state anche denominate cellule “nulle”.

I linfociti LGL, che rappresentano il 10-15% circa delle cellule linfoidi del sangue periferico in un adulto, sono costituiti in grande maggioranza da cellule NK, (Polli e al., 1987; Jondal 1987; Ortaldo 1988) ma includono anche altri tipi di cellule ad attività citotossica CD3⁺.

I granuli citoplasmatici azzurrofilo, che distinguono queste cellule, sono dei lisosomi che contengono, oltre che le perforine, responsabili della loro attività citolitica, diversi enzimi tra cui le idrolasi acide che, dopo colorazione citochimica specifica, danno alle cellule LGL una colorazione citoplasmatica diffusamente granulare. Possono essere inoltre evidenziati in microscopia elettronica dopo colorazione con osmio.

Sul piano funzionale si possono distinguere tre tipi di cellule ad attività citotossica appartenenti alle LGL: cellule NK (Natural Killer), cellule LAK (Lymphokine Activated Killer) e cellule K (Killer).

Le cellule NK riconoscono dei determinanti non ancora definiti su cellule tumorali e su cellule infettate da virus, e possono attaccare le cellule bersaglio direttamente, senza preliminarmente attivazione, senza restrizione MHC, e senza l'intermediario degli anticorpi. Sono dotate di specificità per i loro target, ma finora non sono ben conosciuti né i recettori di riconoscimento né le strutture riconosciute sulle cellule target. Studi recenti hanno dimostrato che le cellule NK possono attaccare specificamente dei target, dai quali siano state preliminarmente attivate (Moretta e al. 1992) e che la loro azione citolitica può essere condizionata da molecole HLA di classe I e in particolare da molecole HLA-Cw (Ciccone e coll. 1990; Moretta e coll. 1992; Versteeg 1992).

La grande maggioranza delle cellule NK esprime sulla membrana recettori per la porzione Fc delle IgG (FcRIII o CD16) ed è dotata di attività citotossica anticorpo-dipendente (ADCC) caratteristica delle cellule K (Perussia e al. 1984; Lanier e Loken 1984) (v. fig. 19). Queste cellule non hanno potere fagocitario, non sono aderenti e, come già detto, non esprimono marcatori specifici né dei linfociti T, né dei macrofagi o dei granulociti. Svolgono un ruolo importante nella resistenza naturale al cancro e alle malattie infettive e sembrano essere implicate, come cellule effettrici, nella GVHD in

Figura 19. Attività citotossica delle cellule NK.

a- Riconoscimento specifico del bersaglio per mezzo del recettore NK-R;

b- Riconoscimento anticorpo-mediato per mezzo del recettore CD16, con ADCC.

corso di TMO. Grazie alle citochine che esse possono liberare dai loro granuli, influiscono sulla differenziazione di altre cellule immunitarie e sulla regolazione della risposta immune. Le cellule NK sono eterogenee per il fenotipo di membrana, per l'attività funzionale, per il ventaglio di cellule bersaglio che possono lisare e per la sensibilità agli interferoni e alle interleuchine. Si trovano normalmente nel sangue e negli organi linfoidi, specialmente nella milza.

La loro origine è ancora incerta (Lanier e al. 1992). Alcuni dati depongono per un'origine midollare, benchè le NK siano normalmente assenti nel midollo osseo, ma altri dati fanno propendere per una loro origine timica, benchè sia stata osservata una normale maturazione di cellule NK in animali atimici. Non è neppure definitivamente stabilito se le NK derivano tutte da un'unica linea cellulare specifica con successiva differenziazione di cloni dotati di recettori diversi, oppure da più linee cellulari specifiche, o ancora se la funzione NK non rappresenti unicamente un'attività comune a differenti tipi di cellule.

E' possibile che le cellule NK appartengano a una linea particolare che esprime marcatori T in uno stadio precoce della differenziazione, e che acquisisce successivamente dei marcatori macrofagici. Alla maturità esse assumono l'aspetto dei linfociti LGL. Oggi si fa strada l'ipotesi che cellule NK e cellule T derivino da un precursore pre-timico comune (Lanier e al. 1992).

Le incertezze sull'origine delle cellule NK derivano essenzialmente dal fatto che a tutt'oggi non è stata ancora riconosciuta con sicurezza una struttura recettoriale specifica, molecolarmente definita, responsabile dell'interazione con il target e dell'attività

killer naturale, che consenta una precisa differenziazione delle cellule NK, indipendente dai caratteri morfologici, dal momento funzionale e dagli altri marcatori espressi sulla membrana. L'identificazione delle cellule NK è per ora basata su un insieme di caratteri, nessuno dei quali è strettamente specifico di un solo tipo di cellula. Essi sono:

- 1) morfologia di cellula LGL;
- 2) attività litica spontanea sulla cellula target K562;
- 3) attività ADCC;
- 4) assenza sulla membrana di recettori TCR-CD3 e sIg;
- 5) espressione dei recettori CD57, CD56, CD16, CD2, CD11b e CD11c;
- 6) formazione di rosette E e/o EA.

Le cellule LAK sono rappresentate in larga maggioranza da cellule NK attivate da alte concentrazioni di IL-2 (Heberman e al. 1987). Esse dimostrano un'accresciuta attività citotossica e una parallela riduzione della specificità nei confronti delle cellule target. La loro attività citotossica si esercita infatti su una grande varietà di cellule tumorali, e coinvolge sia cellule tumorali suscettibili alla lisi da cellule NK, che molte altre non suscettibili (Reynolds e Ortaldo 1987; Ortaldo 1988). E' stato sottolineato che le cellule LAK hanno una maggiore attività citotossica nei confronti delle cellule di tumori solidi, mentre le cellule NK sono più efficaci nei confronti delle cellule neoplastiche emopoietiche.

Il fenotipo di membrana delle cellule LAK non è ancora ben definito e sembra essere diverso a seconda della provenienza delle cellule (sangue periferico, dotto linfatico, tessuti linfoidi periferici), del metodo di attivazione (IL-2, PHA + IL-2, MLC) e del tipo di cellule bersaglio per le quali dimostrano specificità. Questo rivela una notevole eterogeneità in queste cellule delle quali non è definita nè la natura clonale, nè l'appartenenza a una particolare linea cellulare NK. Esse sembrano comunque derivare da precursori eterogenei che, prima della differenziazione IL-2 indotta, non esprimono sulla membrana alcun marcatore, eccetto il recettore ad intermedia affinità per IL-2 (p55), e che dopo IL-2 esprimono, in una piccola percentuale, i marcatori CD3 e CD8.

Ad accrescere le difficoltà interpretative, c'è anche da notare che piccole percentuali di cellule T citotossiche possono esprimere attività del tipo LAK in opportune condizioni di stimolazione (PHA + IL-2) (Moretta e al. 1986).

Dopo attivazione con alte concentrazioni di IL-2, una parte delle cellule LAK dimostra capacità di aderire alla plastica. Queste cellule, denominate adherent-LAK o A-LAK, sono quelle che proliferano più rapidamente (50-100 volte).

Le cellule K, cellule effettrici dell'ADCC, sono capaci di riconoscere e attaccare cellule ricoperte da un anticorpo specifico (v. fig. 20). Sono state denominate cellule K tutte le cellule capaci di produrre citolisi anticorpo-mediata, grazie alla presenza sulla membrana di recettori per l'Fc delle immunoglobuline (monociti, macrofagi, granulociti, neutrofili, eosinofili, linfociti B e cellule NK). Esistono differenti tipi di Fc-recettori con specificità per differenti Ig. Sono detti Fc R i recettori per le IgG, e Fc μ R, Fc R Fc R e Fc R rispettivamente i recettori per le IgM, IgE, IgA e IgD. Nell'ambito dei recettori Fc R ne sono stati riconosciuti 3 differenti con affinità differente per le IgG:

1) FcRI o CD64 che lega specificamente con alta affinità ($1 \cdot 10^{-8}M$) le IgG (in ordine decrescente IgG1 > IgG3 > IgG4 > IgG2) ed è espresso su monociti e macrofagi. Ha un ruolo nell'attivazione dei macrofagi, nella fagocitosi e nell'ADCC.

2) FcRII o CD32 che lega specificamente con intermedia affinità ($5 \cdot 10^{-7}M$) le IgG nello stesso ordine del FcRI ed è espresso su macrofagi, granulociti, neutrofili, eosinofili e linfociti B. Lega gli aggregati di IgG ed ha un ruolo nella fagocitosi, nella clearance degli IC e nell'ADCC.

3) FcRIII o CD16 che lega con bassa affinità ($2 \cdot 10^{-6}M$) le IgG1 e le IgG3 ma non le IgG2 e le IgG4 ed è espresso su cellule NK, granulociti, neutrofili, eosinofili e macrofagi. Il suo ruolo è quello di attivare le cellule NK e di mediare l'ADCC.

In questo lavoro saranno indicate col termine di cellule K solamente le cellule LGL che svolgono ADCC grazie al recettore CD16 (v. più avanti). Non è tuttavia chiara la differenza tra cellule K, alle quali diversi autori non sembrano più riconoscere una configurazione distinta, e cellule NK. E' possibile che si tratti di un unico tipo di cellula, in momenti funzionali diversi, che generalmente può svolgere sia attività ADCC che NK (cellule NK CD16⁺), in alcuni casi può svolgere solo attività NK (cellule NK, CD16⁻) e in altri solo attività ADCC. Certi linfociti LGL possono legarsi a cellule sensibili all'attività NK, per mezzo dei recettori Fc grazie alla mediazione di IgG. Alcune cellule target hanno dunque almeno due siti d'attacco distinti, uno per l'attività NK e l'altro per l'attività ADCC, e si comportano pertanto da bersagli sia per le cellule NK che per le cellule K (Lanier e Loken 1984). La differenza tra l'attività delle cellule NK e K non si osserva che a livello del riconoscimento del bersaglio. Una volta che il contatto tra la cellula effettrice e la cellula bersaglio si è verificato, la lisi sembra avvenire in maniera identica nei due casi. L'ADCC può essere effettuata anche dalle cellule T-citotossiche che esprimono dei recettori per Fc. In generale sembra potersi affermare che l'azione citolitica dei diversi tipi di LGL, come pure dei linfociti T-citotossici, riconosce un meccanismo comune che è attivato da differenti sistemi di riconoscimento (Young e Liu 1988; Young e Cohn 1988).

10. I Recettori di Riconoscimento

Come è stato già precisato, l'azione citotossica delle cellule LGL/CD3⁻ può realizzarsi con due meccanismi differenti, uno indiretto, mediato da anticorpi (ADCC), e l'altro diretto. Il primo tipo di citotossicità può essere espletato da tutte le cellule LGL/CD3⁻ che possiedono il recettore CD16, cioè le cellule K e la grande maggioranza delle cellule NK e LAK. Il secondo tipo di citotossicità è una prerogativa delle cellule NK e LAK ed è dovuto a diverse strutture recettoriali, con differente specificità, solo parzialmente conosciute, e che denominiamo genericamente NK-R. (v. fig. 19 e 20)

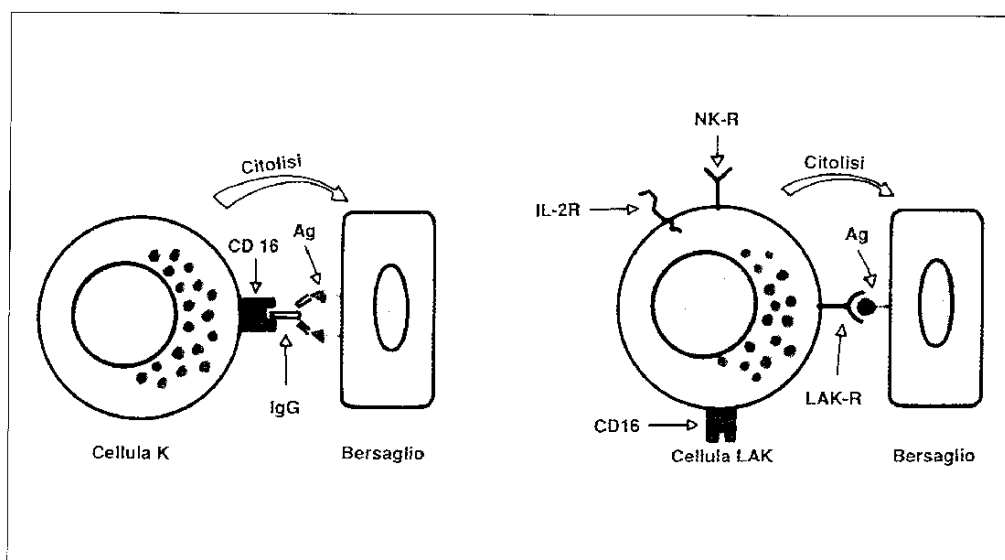


Figura 20. Attività citotossica delle cellule K e LAK.

a- Le cellule K sono dotate di attività ADCC e riconoscono il bersaglio grazie al recettore CD16;

b- Le cellule LAK hanno un recettore specifico (LAK-R) non ancora identificato, un recettore CD16 e un recettore NK-R simile a quello delle cellule NK (v. testo).

10.1. Recettore CD16

E' un recettore che lega specificamente, ma con bassa affinità ($2 \cdot 10^{-6}M$), il Fc delle IgG1 e delle IgG3, denominato anche FcRIII. E' espresso su tutte le cellule K, sulla grande maggioranza delle cellule NK e LAK e, in una forma molecolare differente, sui granulociti neutrofili, eosinofili e sui macrofagi, ma non sui monociti. E' responsabile dell'attività citotossica che le cellule K, NK e LAK esercitano nei confronti di cellule target rivestite da IgG1 e/o IgG3. Data la sua bassa affinità per le IgG si lega efficientemente con aggregati di IgG e con cellule ricoperte di IgG, ma non con IgG monomeriche.

Questo fa sì che le IgG libere nel plasma non interferiscano con il riconoscimento, da parte del CD16, delle cellule ricoperte da IgG, consentendo così l'espletamento dell'azione citotossica sul target da parte delle cellule K, NK e LAK. In questo processo, le IgG svolgono il doppio ruolo di strutture di riconoscimento specifico della cellula target che deve essere eliminata, e di mediatore del legame della cellula citotossica sulla cellula target, garantendo la specificità dell'azione effettrice.

È interessante notare che la molecola CD16 espressa sui granulociti non conferisce a questi attività ADCC. Ciò sembra dovuto al fatto che il CD16 dei granulociti non è una proteina integrale di membrana e, contrariamente al CD16 delle cellule K e NK, non ha domini transmembrana e intracitoplasmatici in grado di trasdurre segnali all'interno della cellula, ed è semplicemente ancorato alla superficie cellulare per mezzo di un fosfatidilinositolo.

Nelle cellule NK è inoltre espresso un omodimero della catena CD3 (o una proteina omologa omodimerica, denominata) che è associato al CD16 e che sembra coinvolto nella trasduzione del segnale fornito dal legame CD16-IgG (Lanier e al. 1989).

10.2. Recettori NK-R

Come abbiamo già detto, la maggior parte delle cellule NK esprime recettori CD16 e può quindi lisare le cellule bersaglio per ADCC. Tuttavia il recettore CD16 non è responsabile dell'attività diretta, specifica delle cellule NK, come dimostra il fatto che il blocco del CD16 con anticorpi monoclonali inibisce l'attività ADCC delle cellule NK, senza modificare l'attività NK. Così una cellula NK dispone generalmente di due distinte strutture di riconoscimento grazie alle quali può attaccare una cellula bersaglio. Una è rappresentata dal recettore CD16, comune alle cellule K, e l'altra, diversa dai recettori TCR e sIg, è rappresentata da un recettore specifico delle NK responsabile del riconoscimento non mediato del target (NK-R).

Questo secondo recettore sembra essere presente nell'insieme delle cellule NK in forme molecolari differenti, probabilmente clonali, che costituiscono complessivamente il repertorio di riconoscimento di tali cellule. Finora i recettori NK-R sono conosciuti solo in piccola parte, grazie agli studi di Ortaldo e coll. (1988) e di Moretta e coll. (1992).

Il primo recettore NK-R è stato identificato da Ortaldo e coll. grazie a un anticorpo monoclonale (Mab#36) specifico per il sito riconosciuto dalle cellule NK sul bersaglio K562. Successivamente è stato prodotto un secondo anticorpo monoclonale specifico per l'idiotipo del Mab#36, denominato anti-ID, e si è visto che questo reagiva specificamente con le cellule umane NK, ma non con altre cellule (T e B linfociti, macrofagi e neutrofili) inibendo l'azione delle cellule NK sul target K562. È stato così dimostrato che le cellule NK possiedono un particolare recettore di riconoscimento identificato dall'anticorpo monoclonale "anti-ID", che è stato denominato NK-R (Ortaldo 1988).

Questo recettore è diverso dagli altri marcatori di membrana conosciuti e in particolare dal CD16, e sembra costituito da una singola catena polipeptidica di 80 kD. Non è chiaro se il riconoscimento del bersaglio da parte delle cellule NK è specifico oppure no. Apparentemente non sembra essere del tutto specifico, ma questo contrasta con la rigorosa specificità evidenziata negli esperimenti che hanno portato all'identificazione

di questo NK-R. E' possibile che il sito da questo riconosciuto sia presente su diverse cellule bersaglio, oppure che determinate cellule NK possiedano diversi recettori con differenti specificità, o ancora che esistano differenti cloni o sottopopolazioni di cellule NK con differenti specificità. Un certo numero di dati sembra deporre per quest'ultima ipotesi. Moretta e coll. (1992) hanno dimostrato, con esperimenti di MLC (cultura linfocitaria mista) allogenica, che le cellule NK possono essere attivate specificamente da strutture antigeniche non self presenti sulle cellule stimolanti. Le cellule NK così attivate lisano specificamente le cellule stimolanti, ma non le cellule autologhe, nè la maggior parte delle altre cellule allogeniche testate.

Sono stati così identificati cinque diversi cloni NK alloreattivi ognuno dei quali riconosce nelle cellule target un'allospecificità differente. Poichè il 60% del pannello di cellule target testate non era lisato da nessuno dei cloni NK, l'esistenza di altre allospecificità NK e dei corrispondenti recettori NK sembra probabile. Pertanto le cellule NK sembrano disporre nell'insieme di un repertorio di riconoscimento abbastanza ampio ma non così come quello delle cellule T e B. Il fatto che le cellule NK presenti in un determinato individuo non dispongano di recettori NK-R self-reattivi suggerisce che, analogamente a quanto accade per i linfociti T e B, il repertorio individuale NK vada incontro nell'ontogenesi a una delezione dei cloni autoreattivi.

Grazie all'impiego di due anticorpi monoclonali specifici (EB6 e GL183) Moretta e coll. hanno potuto dimostrare che i recettori NK-R precedentemente identificati appartengono a una famiglia di molecole di 58 kD associate sulla membrana con la catena CD3. Tali anticorpi danno, con i diversi cloni NK, 4 fenotipi (++, +-, -, -) strettamente correlati con i 5 gruppi di allospecificità NK-R dimostrati in cultura linfocitaria mista.

11. Target e Molecole Protettive

Le strutture molecolari riconosciute dai recettori NK-R sulle cellule target sono scarsamente conosciute. E' stato possibile dimostrare comunque che esistono due tipi di strutture in gioco in tale riconoscimento:

- a) strutture responsabili della suscettibilità alla lisi (allospecificità NK), che sembrano essere ereditate come caratteri autosomici recessivi;
- b) strutture di protezione nei confronti della lisi da NK, che sono invece ereditate come caratteri dominanti.

11.1. Molecole target

Un ruolo importante nel condizionare l'attivazione in vitro delle cellule NK nei confronti di target allospecifici, e la loro successiva attività litica, sembra essere svolto dalle molecole HLA-Cw e più particolarmente da alcuni siti aa. della tasca dei peptidi di tali molecole (Moretta e al. 1992). Cellule NK alloreattive nei confronti di un alloantigene denominato NK-1 possono essere prodotte in vitro mediante stimolazione di cellule omozigote per i residui Asn⁷⁷, Lys⁸⁰ nel dominio 1 della molecola HLA-C, con cellule target omozigote per i residui Ser⁷⁷, Asn⁸⁰. Cellule NK alloreattive nei confronti di un secondo alloantigene NK-2 possono essere prodotte in una situazione di stimolazione reciproca (Colonna e al. 1993). Cellule eterozigote per tali coppie di aa. non sono in grado di indurre la produzione di cellule NK alloreattive specifiche, nè di fungere da target per la lisi da parte di cloni NK che riconoscono le specificità NK-1 o NK-2 (Colonna e al. 1993).

11.2. Molecole protettive

Queste ultime sono rappresentate da molecole HLA di classe I, e in particolare da molecole Cw, come è stato possibile dimostrare attraverso esperimenti di transfezione genica, e con lo studio di famiglie con aplotipi HLA ricombinanti. Non tutti gli alleli dei diversi loci HLA sono in grado di conferire protezione nei confronti della lisi da NK. Per le molecole HLA-Cw sembrano determinanti la presenza di una serina nella posizione 77 e di una asparagina nella posizione 80 oppure di una asparagina 77 e di una lisina 80 nella tasca di riconoscimento dei peptidi. La coppia di aa. Ser⁷⁷, Asn⁸⁰ è condivisa nel dominio 1 dalle molecole HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8 e da qualche HLA-Cw blank. La coppia di aa. Asn⁷⁷, Lys⁸⁰ è condivisa dalle molecole HLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6 e da alcune molecole Cw blank. Come abbiamo già detto, la condizione eterozigote per gli aa. 77 e 80 (es. Cw1, Cw4) è protettiva verso le NK. Un epitopo caratterizzato dalla presenza di un acido aspartico in posizione 74 sembra invece essenziale per la protezione data dalle molecole HLA-A3, A11, A24, A68, A69, B7 e B27. La presenza di una istidina nella stessa posizione, che caratterizza la molecola HLA-A2, non protegge invece dalla lisi da NK. Le modalità esatte con le quali le molecole HLA di classe I esercitano la loro azione protettiva non sono ancora elucidate. Sono state formulate due differenti ipotesi:

a) La cellula NK dispone di due distinti recettori di superficie in grado di interagire uno con la struttura NK-allosppecifica, e l'altro con molecole HLA protettive. Il primo tipo di interazione invia alla cellula NK un segnale positivo per la lisi, mentre il secondo invia un segnale negativo che inibisce la lisi. Per conseguenza, la mancata espressione sulla cellula target di molecole HLA o l'espressione di molecole HLA non riconosciute dal recettore NK, consente l'interazione della cellula NK con la struttura NK-allosppecifica e da luogo alla lisi della cellula target. Al contrario quando il recettore della cellula NK riconosce sulla cellula target una molecola HLA protettiva non avviene la lisi.

b) La cellula NK dispone di un solo recettore in grado di reagire specificamente con una struttura NK-allosppecifica del target. L'interazione tra queste due strutture invia alla cellula NK il segnale di lisi. Le molecole HLA, a seconda della loro struttura, possono mascherare oppure no la struttura NK-allosppecifica al recettore NK, impedendo nel primo caso l'azione litica della cellula NK, e consentendola nel secondo caso.

E' possibile che l'effetto protettivo delle molecole HLA di classe I non sia dovuto alle molecole HLA di per se stesse, ma piuttosto ai peptidi da esse presentati. L'istidina in posizione 74 che chiude un recesso della tasca può determinare una inadeguata presentazione dei peptidi.

In un determinato individuo le cellule NK non presentano normalmente attività litica nei confronti di cellule autologhe. Questo può essere dovuto a un processo di selezione dei precursori NK che porta alla delezione delle cellule NK self-reattive. Alternativamente è possibile che l'espressione sulle cellule autologhe di molecole HLA presentanti peptidi autologhi protettivi inibisca l'azione litica delle cellule NK. In questo caso bisogna ipotizzare che tutte le cellule somatiche normali (escluse ovviamente quelle alterate da processi neoplastici o da infezioni virali) siano protette con tale meccanismo, e che esprimano quindi molecole HLA di classe I con peptidi self-protettivi.

E' stato però dimostrato che non tutti i peptidi self sono in grado di esercitare tale effetto protettivo, e sembrerebbe che i peptidi protettivi derivino da determinati gruppi di proteine autologhe e in particolare da proteine altamente conservate nella scala evolutiva e presenti normalmente in tutte le cellule somatiche. Tra queste, la proteina HSP90, alcune proteine ribosomiali, l'istone H3, il fattore di allungamento EF2 sono stati identificati come i peptidi protettivi presentati dalla molecola HLA-B27 (Jardetzky e coll. 1991).

L'assenza di cloni NK self-reattivi è stata dimostrata da Moretta e coll. (1992). Questo apre il discorso sul repertorio di cloni NK che ciascun individuo possiede e su come tale repertorio venga originato.

12 Repertorio e Origine delle Cellule NK

Abbiamo precedentemente sottolineato che il repertorio delle cellule NK è meno vasto di quello dei linfociti T e dei linfociti B, ma che è in grado comunque di coprire con relativa specificità un numero abbastanza vario di target differenti.

In base alle analogie esistenti nel riconoscimento del target tra cellule NK e linfociti T, è stato ipotizzato che nella scala evolutiva i linfociti T siano derivati da cellule primordiali NK-like, e che il repertorio di riconoscimento individuale delle cellule NK potrebbe essere il risultato di una selezione a livello timico guidata dalla differente affinità per le molecole HLA e per i peptidi che esse presentano. Il repertorio finale delle cellule NK sarebbe costituito da cellule con recettori ad alta affinità per molecole HLA di classe I + peptidi self protettivi (Versteeg e al. 1992).

Invece il repertorio iniziale dei precursori NK sarebbe costituito da cellule con alta affinità e da cellule con intermedia o bassa affinità per le molecole HLA-peptide. Poiché i cloni NK autoreattivi sono quelli sui quali le molecole HLA non esercitano protezione, sembra logico supporre che nell'ontogenesi siano selezionate negativamente le cellule NK con recettori a bassa affinità per le molecole HLA-self e positivamente quelle con recettori ad alta affinità per le molecole HLA-self (Versteeg e al. 1992).

Questo modello di selezione ricalca quanto avviene nella prima tappa della selezione intratimica dei linfociti T (selezione positiva) e fornisce una buona spiegazione dei fenomeni osservati sulla attività delle cellule NK mature. Esso giustifica inoltre l'ipotesi che nella scala evolutiva i linfociti T siano derivati da cellule primordiali NK-like per un cambiamento del programma genetico che porta all'inversione funzionale della cellula effettrice attraverso una seconda tappa di selezione negativa, con delezione delle cellule che hanno recettori specifici per molecole HLA self + peptide self. In definitiva il repertorio delle cellule NK sarebbe in grado di reagire nei confronti di:

- 1) cellule con target specifico che non esprimono o che esprimono male molecole HLA-self;
- 2) cellule con target specifico che esprimono molecole HLA self presentanti peptidi estranei o non protettivi.

Al contrario il repertorio dei linfociti T è in grado di reagire nei confronti di:

- 1) cellule con molecole HLA-self che presentano peptidi non-self;
- 2) cellule con molecole HLA-self che presentano peptidi self sequestrati e che non hanno quindi selezionato i cloni T specifici.

Studi recenti sull'ontogenesi fetale e lo sviluppo timico dei linfociti depongono per un'origine comune delle cellule NK e T da un precursore pre-timico di fenotipo CD34⁺ CD7⁺ CD2⁻ CD5⁻ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ CD16⁻ CD56⁻ con espressione citoplasmatica di CD3 (Lanier e al. 1992). La divergenza sembra avvenire in fase pre-timica con l'acquisizione di CD2 e CD5, per la cellula progenitrice T, e con perdita di CD34, espressione di CD56 e, incostantemente, di CD16, per la cellula progenitrice NK.

Le cellule LAK si differenziano dalle cellule NK in quanto la loro attività elettiva sulle cellule FEMX non è inibita dall'anticorpo monoclonale Mab#36 e inoltre le cellule NK non dimostrano alcuna attività sulle cellule FEMX. D'altra parte le cellule LAK hanno

attività killer sia sulle cellule FEMX che sulle cellule K562. Questo dimostra che le cellule LAK possiedono due strutture di riconoscimento distinte, una apparentemente identica a quella delle cellule NK, cioè il recettore NK-R, che si lega al sito complementare presente nelle cellule K562, e l'altra non ancora identificata che si lega a un sito presente su entrambe le cellule bersaglio, FEMX e K562 (Ortaldo 1988).

13. I Marcatori di Superficie

Come abbiamo detto l'attività citolitica delle cellule K, NK e LAK è avviata dal riconoscimento del bersaglio operato da particolari recettori (CD16 per tutte tre, NK-R per le cellule NK e LAK, e un terzo recettore non ancora definito per le cellule LAK) che rappresentano le strutture di membrana specifiche di questa categoria di cellule. Purtroppo però sono disponibili commercialmente solo anticorpi monoclonali specifici per il recettore CD16, ma non per gli altri due recettori. Esistono tuttavia diversi marcatori di superficie espressi su queste cellule che possono essere determinati con anticorpi monoclonali e che, pur non essendo strettamente specifici di esse, permettono di riconoscerle e di suddividerle in diversi subsets. Un elenco completo dei marcatori di superficie delle cellule LGL/CD3⁻ è dato nell'appendice, insieme con l'indicazione delle principali denominazioni comunemente adoperate e delle altre cellule in cui sono espressi. Le caratteristiche dei principali marcatori di superficie e dei relativi anticorpi sono esposte successivamente (pag. 81-82).

13.1. Cellule K

Sono le cellule di questo gruppo meno ben caratterizzate dal punto di vista del fenotipo di superficie. Possiedono tutte il marcatore CD16, corrispondente al recettore per il sito immunoglobulinico Fc_γ, responsabile del legame con le IgG e quindi del riconoscimento mediato di bersagli ricoperti da IgG. Questo marcatore non è però specifico delle cellule K, ma di tutte le cellule dotate di attività ADCC (Lanier e al. 1983; Lanier e Loken 1984; Perussia e al. 1984; Ortaldo 1988), e quindi anche delle cellule NK e LAK (v. fig. 19 e 20).

13.2. Cellule NK

Le cellule NK possono essere isolate in gradiente discontinuo di Percoll con un alto grado di purezza, e possono essere individuate attraverso lo studio dei marcatori di membrana.

Accanto al recettore CD16, responsabile della loro attività ADCC, la grande maggioranza delle cellule NK esprime l'antigene CD56 che, a parte queste cellule, è presente solo in una piccola percentuale di linfociti T CD8 positivi (Lanier e al. 1987). L'antigene CD57 è coespresso nel 60% circa delle cellule NK CD16 positive e nel 20% circa dei linfociti T CD8 positivi (CD8^{HD}), mentre è assente nel 40% circa delle cellule NK (Lanier e al. 1983) (vedi fig. 7).

Le cellule NK esprimono inoltre tre differenti molecole eterodimeriche appartenenti alla famiglia delle integrine sub-famiglia 2. Queste sono: LFA-1 o CD11a/CD18, MAC-1 o CD11b/CD18 e p150, 95 o CD11c/CD18. Questi tre complessi sono implicati nella funzione litica delle cellule NK. Il CD11c, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale anti-LeuM5, reagisce anche con i monociti; il CD11b (recettore del C3bi) riconosciuto

dall'anticorpo anti-Leu15 reagisce anche con la totalità dei monociti e con il 20% circa dei linfociti T-citotossici. Altri marcatori di superficie espressi in tutte le cellule NK, ma largamente presenti in altre popolazioni cellulari, sono: il CD45RA, che è riconosciuto dagli anticorpi anti-2H4 e anti-Leu18 ed è presente anche nei linfociti B e in alte percentuali di linfociti T sia CD4⁺ che CD8⁺; e il CD7 che è espresso in quasi tutti i linfociti T. L'antigene CD8 è espresso nel 20% circa delle cellule NK, nelle quali ha caratteristicamente una densità di membrana bassa o intermedia (Lanier e al. 1984; Arras e Contu 1988).

Sembra che la presenza dell'antigene CD8^{HD} sia peculiare dei linfociti T, mentre l'antigene CD8^{LD} sia caratteristico degli NK. Altri antigeni, come Leu8, e CD69 possono essere espressi in percentuali variabili di cellule NK, mentre il CD2 è presente in quasi tutte le cellule NK. L'espressione di CD2 sulle cellule NK è coinvolta con l'attivazione del programma citolitico. A differenza di quanto avviene per i linfociti T, l'attivazione delle cellule NK da parte di anticorpi anti-CD2 non induce proliferazione benchè stimoli l'espressione della catena del IL-2R. Devono essere inoltre ricordati i recettori per il C3b (CR1 o CD35), presente oltre che in molti NK anche in monociti, granulociti, linfociti B e in un piccolo numero di linfociti T, per l'IL-2 (CD25) presente nei linfociti T attivati e in una certa percentuale di linfociti B attivati, e gli antigeni CD38, presente nella maggior parte dei linfociti NK e dei T attivati, e un particolare antigene denominato neo-CRP che rappresenta una forma modificata della molecola della proteina C reattiva (CRP nativa) e che è espressa ad alta densità (CRP bright) nei linfociti B e a bassa densità (CRP dim) nei linfociti NK CD16⁺, CD57⁺, CD11b⁺, CD56⁺ (Bray e al. 1987).

Recentemente è stato identificato con un anticorpo monoclonale (moAb 3.2.3) un recettore capace di mediare segnali transmembrana in cellule NK e A-LAK. Si tratta di una molecola dimerica di 60 kD, composta di monomeri di 30 kD legati da ponti S-S, presente sulle cellule NK e con maggiore densità sulle cellule A-LAK. E' anche espressa da granulociti, ma non da monociti e B linfociti (Chambers W.H. e al. 1989).

La sequenza nucleotidica del gene che la codifica è stata determinata (Giorda R. e al. 1990). Questa proteina ha un'alta omologia con il recettore a bassa affinità per le IgE (Fc RIIb o CD23), il che suggerisce che il suo ligando sia un carboidrato.

13.3. Cellule LAK

Il fenotipo di membrana delle cellule LAK è meno chiaramente definito di quello delle cellule NK. A parte il fatto che attività LAK può essere dimostrata anche in cellule normali del sangue periferico CD3⁺, le cellule LAK (attivate da IL-2) appartengono quasi tutte alle cellule LGL/CD3⁻, e sembrano avere una comune cellula progenitrice con le cellule NK (Heberman e al. 1987). Questa ha il fenotipo CD3⁻, CD8⁻, CD2⁻, CD11b⁻, CD16⁻, CD56⁻. Questa cellula acquisirà dapprima l'orientamento in senso NK con l'espressione del recettore specifico NK-R, non sappiamo se contemporaneamente o meno all'acquisizione del secondo recettore CD16 (Ortaldo 1988).

Da quanto è stato detto nei paragrafi precedenti sembra evidente che a questo punto sarà l'acquisizione del secondo recettore specifico per il bersaglio elettivo FEMX che segnerà la differenziazione della cellula NK in cellula LAK (Ortaldo 1988).

Questa possiede in questa fase altri marcatori di superficie e in particolare il CD56

e il CD25 indispensabile perchè l'IL-2 possa indurre l'effettiva capacità LAK. E' stato dimostrato che sotto stimolo con IL-2 la cellula LAK coesprime anche il recettore CD8. Saranno necessari studi in citofluorimetria a flusso multiparametrica per stabilire se questa categoria di cellule rientra nel subset appartenente ai linfociti con CD8 a intermedia densità (CD8^{MD}) o a bassa densità (CD8^{LD}). Sicuramente queste cellule vanno differenziate dalle cellule CD3⁺ con attività LAK, appartenenti ai linfociti T, e che necessitano di 2-3gg. di cultura per manifestare la massima citotossicità in vitro contro meno di 24 ore per le cellule LAK CD3⁻. L'espressione di altri marcatori presenti nelle cellule deve ancora essere definito.

Deve essere precisato che accanto al fenotipo prevalente CD3⁻ CD8⁺ CD16⁺, esiste un subset minore di cellule con attività LAK che hanno un fenotipo CD3⁺ CD16⁻. Attività LAK può essere sviluppata anche in cellule CD3⁻ CD16⁻ CD2⁺ mediante stimolazione con LFA-3 (Hersey e Bolhuis 1987).

14. Sottopopolazioni delle Cellule NK

Da un punto di vista funzionale sono state individuate tre categorie di cellule LGL/CD3⁻: NK, LAK e K. In base alla definizione generale data, poichè questi tre tipi di cellule sembrano possedere recettori specifici per il bersaglio potrebbero essere considerati delle vere popolazioni, tuttavia attualmente con i moAb disponibili possono essere distinte solamente per il recettore CD16 che possiedono tutte e tre, e per l'assenza sulla loro membrana del CD3. Questo giustifica la loro inclusione in un'unica popolazione linfocitaria, distinta in tre sottopopolazioni. Nell'ambito delle cellule NK è stato possibile differenziare tre subsets di cellule distinte per attività funzionale e per fenotipo di membrana (Ortaldo 1988; Perussia e al. 1984; Lanier e al. 1987).

Un primo subset caratterizzato da alta attività NK sul bersaglio specifico K562 e da attività ADCC è riconoscibile per il fenotipo CD16⁺ 56⁺ 57⁻ 3⁻, che rappresenta il 4% circa dei linfociti totali del sangue periferico. Questo può anche essere distinto in due sottogruppi in base alla coespressione o meno dell'antigene CD8.

Un secondo subset con attività NK considerevolmente variabile da un individuo all'altro e con chiara attività ADCC è riconoscibile in base al fenotipo CD16⁺ 56⁺ 57⁺ 3⁻ (6% circa). Anche questo può coesprimere o meno l'antigene CD8. La maggior parte delle cellule di questo subset coesprime anche l'antigene CD11b e l'antigene CRP dim (Bray e al. 1987).

Il terzo subset con attività NK debole e nessuna attività ADCC possiede il fenotipo CD16⁻ 3⁻ 56⁺ 57⁺, che rappresenta meno dell'1% dei linfociti totali. L'espressione degli antigeni CD57, CD11b e CD3 sembra poter consentire la individuazione di tre stadi di differenziazione distinti delle cellule NK (Lanier e al. 1983): uno stadio iniziale con fenotipo CD57⁺ 11b⁻ 3⁻, uno stadio intermedio CD57⁺ 11b⁻ 3⁺ e uno stadio maturo CD57⁺ 11b⁺ 3⁻. La definizione di sottopopolazioni particolari nell'ambito delle cellule LAK e K è oggetto di studio.

15. Funzioni delle Cellule NK

La funzione biologica delle cellule LGL/CD3⁻ è quella di distruggere cellule estranee all'organismo, e in particolare le cellule tumorali e quelle infettate da virus o anche da altri agenti patogeni. Si tratta quindi di cellule citotossiche. Esse agiscono sul bersaglio appropriato, dopo averlo specificamente individuato, grazie a particolari recettori che ne permettono il legame su determinati antigeni presenti alla superficie della cellula bersaglio. Una volta avvenuto il contatto con la cellula bersaglio, qualunque sia il recettore che ha permesso questo contatto, e il tipo di cellula citotossica (NK, K, LAK e anche TCTL) che lo realizza, le tappe successive che portano alla distruzione della cellula bersaglio sono le stesse (Young e Liu 1988; Young e Cohn 1988; Male e al. 1988).

Schematicamente l'azione effettrice di queste cellule si svolge in due tappe (vedi anche paragrafo 4.6.2):

a) attivazione della cellula effettrice.

E' indotta dal riconoscimento specifico del bersaglio che deve garantire che l'azione lesiva non coinvolgerà altre cellule e in particolare cellule autologhe. Esiste tuttavia anche la possibilità che l'attivazione avvenga indipendentemente dal riconoscimento recettoriale, per l'intervento di fattori stimolanti di varia natura come anticorpi monoclonali e lectine. Subito dopo il contatto specifico tra la cellula effettrice e la cellula bersaglio, la prima va incontro a una riorganizzazione strutturale del citoplasma nella quale consiste l'attivazione che dura complessivamente circa 10'. Schematicamente essa comporta: orientamento dell'apparato di Golgi e in particolare delle sue strutture microtubulari verso la zona di contatto con la cellula bersaglio; allargamento della zona di contatto con formazione di interdigitazioni tra le due membrane; concentrazione dei granuli verso la zona di contatto, trasporto lungo l'apparato microtubulare fino alla membrana cellulare dove per esocitosi i granuli liberano il loro contenuto sulla membrana della cellula bersaglio.

b) distruzione della cellula bersaglio

Le molecole responsabili della lesione della membrana sulla cellula bersaglio sono state recentemente identificate e caratterizzate come proteine di circa 65 kD denominate perforine. Esse, come dice il loro nome, hanno appunto la proprietà di perforare la membrana della cellula bersaglio. Le perforine, contenute nei granuli citoplasmatici delle cellule LGL, sono veicolate da molecole di condroitinsolfato A proteoglicano fino al momento dell'esocitosi. Le molecole di condroitinsolfato A (denominate anche protettine) rimangono aderenti alla membrana della cellula effettrice dove esercitano una protezione nei confronti di un possibile danno autologo da parte delle perforine. Queste ultime invece, liberate dalle molecole di protettina penetrano attraverso la membrana della cellula bersaglio perforandola in tutto il suo spessore. In presenza di ioni calcio le molecole di perforina hanno la proprietà di polimerizzarsi dando luogo alle poliperforine che realizzano delle strutture tubulari, cioè dei veri e propri fori nella membrana della cellula bersaglio.

E' stato possibile distinguere due tipi di strutture poliperforiniche in base al diametro del foro realizzato: poli-P₁ di circa 16 nm. e poli-P₂ con fori più piccoli di 5-7 nm. Sembra che alcune cellule NK producano esclusivamente delle poli-P₁, dimostrando che le poli-P₂ non sono indispensabili all'effetto citolitico. Alcune altre proteine dotate di effetto citolitico sembrano essere prodotte dalle cellule LGL, come le proteine LT (o linfotossine) e le proteine NKCF che potrebbero essere lo stesso TNF, ma non è per ora chiaro se e come svolgano un ruolo nella lisi cellulare indotta dalle cellule LGL. In realtà è possibile che la perforazione della membrana della cellula bersaglio non sia di per sé sufficiente a determinare la lisi. I canali transmembrana realizzati dalle perforine rendono verosimilmente possibile il trasporto all'interno della cellula di ioni Na⁺ e quindi di H₂O con conseguente rigonfiamento e lisi della cellula. Ma in realtà il tipo di lesione che consegue normalmente alla perforazione della membrana è rappresentato da un processo di apoptosi, che comporta una frammentazione nucleare seguita da frammentazione della cellula. Ciò implica la penetrazione dentro la cellula, probabilmente attraverso i fori della membrana, di altri fattori responsabili della lesione nucleare. Uno di questi potrebbe essere la leucalessina di recente identificazione. Ma studi ulteriori sono necessari per meglio definire tale processo.

Accanto alla funzione citotossica è stato recentemente riconosciuto che le cellule NK possono esercitare un'azione regolatrice sul processo di differenziazione di altre cellule grazie alla presenza di granuli contenenti mediatori chimici del tipo delle linfochine come IL-1, IL-2, IFN , TNF, M-CSF, GM-CSF, che possono essere liberati dalle cellule NK stimulate da un antigene o da una lectina (Male e al. 1988; Hercend e Schmidt 1988; Jondal 1987; Ortaldo 1988).

Durante il processo di attivazione le cellule NK esprimono inoltre sulla superficie alcuni recettori come il recettore della transferrina o CD71 e la catena del recettore IL-2 o CD25.

16. Principali Marcatori delle Cellule NK

NK-R

Recettore di riconoscimento specifico delle cellule NK per il target K562. E' presente anche sulle cellule LAK. Peso molecolare circa 80 kD. E' riconosciuto dall'anticorpo monoclonale Mab#36.

CD16

Recettore del frammento Fc delle IgG (Fc RIII), denominato anche Leu11, è una glicoproteina di peso molecolare 50-70 kD. E' espresso in tutte le cellule K, nella grande maggioranza delle cellule NK e LAK, in un piccolo subset di linfociti T-citotossici non MHC-ristretti, in granulociti neutrofili e in macrofagi. E' responsabile dell'attività citotossica ADCC. E' riconosciuto da diversi anticorpi monoclonali che reagiscono con differenti siti antigenici presenti sulla molecola, denominati Leu11a, Leu11b e Leu11c. Il primo sito è riconosciuto dagli anticorpi NKP15, Leu11a e Tek-NK1; il secondo è riconosciuto dagli anticorpi Leu11b, VEP13, GO22, OK-NK e AB8.28, che si differenziano tra loro per l'effetto inibitorio sull'attività NK o per la capacità di indurre attività citotossica aspecifica, o per un effetto regolatorio sul meccanismo della lisi; il terzo, Leu11c, è riconosciuto dall'anticorpo B73.1. Il CD16 ha bassa affinità per le IgG e nell'uomo si lega preferenzialmente con le IgG1 e le IgG3. Due forme diversamente ancorate sono espresse sulle cellule NK e sui granulociti. Le cellule NK hanno una isoforma transmembrana (Fc RIIIA), mentre un polipeptide di 25 kD (Fc RIIIB) è ancorato alla membrana dei neutrofili da un legame glico-fosfatidil-inositolo (GPI). Recentemente la catena del CD3 è stata trovata associata al CD16 in cellule NK (Lanier e al. 1989).

CD56

Molecola di circa 200-210 kD, presente sulla membrana di tutte le cellule NK e LAK e dei linfociti T-citotossici non MHC-ristretti. La densità di questo marcatore aumenta in modo spiccato nelle cellule LAK e nelle cellule NK attivate. Può essere anche espresso su cloni T CD4⁺ e CD8⁺ IL-2 attivati. E' identificato dagli anticorpi monoclonali anti-Leu19 e anti-NKH-1.

CD11

Si tratta di 3 antigeni diversi costituiti da due catene polipeptidiche, una comune ai 3 antigeni (p.m. 95 kD) e una specifica per ciascuno degli antigeni. La catena costituisce il marcatore CD18 e corrisponde all'antigene di funzione leucocitaria LFA-1. Il marcatore CD11, la cui specificità è definita dalla subunità, è suddiviso in 3 antigeni denominati CD11a, CD11b e CD11c. Il primo (p.m. 180 kD), corrispondente alla catena dell'antigene di funzione leucocitaria LFA-1, è probabilmente identico al recettore per l'IL-4, ed è riconosciuto dall'anticorpo monoclonale anti-LFA-1. Il secondo (p.m. 160 kD), corrispondente al recettore del C3bi o CR3, è riconosciuto dagli anticorpi monoclonali anti-OKM1, anti-Leu15 e anti-Mo1 ed è espresso oltre che su cellule NK anche su monociti, su un subset di T linfociti e su granulociti. E' anche recettore di due

fattori della coagulazione (fattore X e fibrinogeno) e dello Zymosan. L'antigene CD11c (p.m. 150 kD) è riconosciuto dagli anticorpi monoclonali anti-Leu M5, anti-S-HCL-3 e anti-3,9 ed è espresso su cellule NK e su monociti. La mancata sintesi della catena determina non solo l'assenza del marcatore CD18 sulla membrana cellulare, ma anche la mancata espressione del marcatore CD11. Questo si accompagna a un quadro clinico caratterizzato da ritardo del distacco del cordone ombelicale, gravi ulcere cutanee e gengivopatia.

Per maggiori dettagli sulla molecola di adesione CD11/CD18 e sui suoi ligandi ICAM-1 e ICAM-2 si rimanda all'apposito capitolo sulle molecole di adesione.

CD57

Antigene di p.m. 110 kD, denominato anche HNK-1. E' espresso in una parte delle cellule NK e LAK, e in un subset di linfociti T-citotossici. La sua densità sulla superficie delle cellule aumenta con l'attivazione. E' identificato dagli anticorpi monoclonali anti-Leu7 e anti-HNK-1.

CD25

Recettore dell'IL-2 a bassa affinità. E' costituito da un polipeptide di 55 kD (TAC) espresso sulle cellule LAK, sui linfociti NK, T e B attivati e su monociti e macrofagi attivati. Il recettore per l'IL-2 può essere presente sulla membrana delle cellule in tre diverse forme molecolari con diversa affinità per l'IL-2. Una forma monomerica a bassa affinità (10^{-8} m) composta da una catena polipeptidica di 55 kD, sprovvista praticamente di una porzione intracitoplasmatica e quindi incapace di trasdurre i segnali all'interno della cellula. Una seconda forma monomerica, ad intermedia affinità per l'IL-2 (10^{-9} m), è composta da una catena polipeptidica di 75 kD che, grazie a un lungo segmento intracitoplasmatico è capace di trasmettere i segnali all'interno della cellula. Una terza forma, ad alta affinità (10^{-11} m) è un dimero composto dalle due catene a e associate in modo covalente. La forma dimerica del recettore è presente sui linfociti T attivati o da un antigene specifico o da mitogeni come la fitoemoagglutinina. La espressione del CD25 dopo stimolazione antigenica è transitoria e non è più presente dopo una divisione cellulare. I linfociti T a riposo del sangue periferico sono in generale privi di IL-2 R funzionale. Il recettore monomerico è invece espresso sulle cellule NK e su alcune cellule T a riposo. Il CD25 è riconosciuto dagli anticorpi monoclonali anti-TAC, anti-7G7/B6, IL-2R1, e DAKO-IL-2R.

Bibliografia

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company 1991.
2. Acuto O., Larocca M.: T-cell antigen receptor expression in the thymus. *Human Immunol.*, 18: 93-110, 1987.
3. Adorini L.: Il secondo recettore dei linfociti T. *Aggiornamento del Medico*, 11: 703-709, 1987.
4. Alexander D., Shiroo M., Robinson A., Biffen M., Shivnan E.: The role of CD45 in T-cell activation resolving the paradoxes. *Immunol. Today*, 13: 477-481, 1992.
5. Allison J.P., Lanier L.L.: The T-cell antigen receptor gamma gene: rearrangement and cell lineages. *Immunol. Today*, 8: 293-296, 1987.
6. Arnaiz-Villena A., Timón M., Rodriguez-Gallego C., Pérez Blas M., Corell A., Martin-Villa J.M., Regueiro J.R.: Human T-cell activation deficiencies. *Immunol. Today*, 13: 259-265, 1992.
7. Arras M., Contu L.: Heterogeneity of the CD8 lymphocytes in healthy and HIV-1 infected subjects. *Immunol. Clin.*, 8: 25-36, 1989.
8. Arras M., Pizzati A., Mulargia M., Vacca A., Piras B., Lecca U., Contu L.: Indagini sulle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie nei neonati a termine. *Atti X° Congr. Soc. Ital. Immunol. e Immunopatol.*, pag. 116. Cagliari 10-12 Maggio 1989.
9. Bloom B. R., Salgame P., Diamond B.: Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today*, 13: 131-136, 1992.
10. Blue M.L., Craig K.A., Anderson K.A., Anderson P., Branton K.R. Jr., Schlossman S.F.: Evidence for specific association between class I major histocompatibility antigens and the CD8 molecules of human suppressor/cytotoxic cells. *Cell*, 54: 413-421, 1988.
11. Bottomly K.: A functional dichotomy in CD4+ T-lymphocytes. *Immunol. Today*, 9: 268-274, 1988.
12. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoni B., Bennet W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.: The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518, 1987.
13. Bray R.A., Samberg N.L., Landay A.L., Gewurz H., Potempa L.A.: Identification of a novel antigenic specificity present on the surface of human natural killer cells and B lymphocytes. *Clin. Immunol. Newsletter*, 8:137-140, 1987.
14. Brenner M.B., McLean J., Scheft H., Riberdj J., Ang S.L., Seidman J., Devlin P., Krangel M.S.: Two forms of the T-cell receptor protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 325: 689-693, 1987.
15. Brown J.H., Jardetzky T., Saper M.A., Samraoni B., Bjorkan P.J., Wiley D.C.: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332: 845-850, 1988.

16. Colonna M., Brooks E.G., Falco M., Ferrara G.B., Strominger J.L.: Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*, 1993 (in press).
17. Dausset J., Contu L.: Is the MHC a general self-recognition system playing a major unifying role in an organism? *Human Immunol.*, 1: 5-17, 1980.
18. Dausset J., Pla M.: HLA, Complexe Majeur d'Histocompatibilité de l'homme. Flammarion edit., Paris, 1985.
19. De la Hera A., Toribio M.L., Martinez A.C.: Two pathways of human thymocyte development can be defined by monoclonal anti-CD1 antibody. *P.N.A.S.*, 1989.
20. Doherty P. C.: The function of T cells. *Brit. J. Haematol.*, 81: 321-324, 1992.
21. Dorf M.E., Kuchroo V.K., Collins M.: Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol. Today*, 13: 241-243, 1992.
22. Doyle C., Strominger J.L.: interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, 330: 256-259, 1987.
23. Eiden L.E., Lifson J.D.: HIV interactions with CD4: a continuum of conformations and consequences. *immunol. Today*, 13: 201-206, 1992.
24. Emmrich F.: Cross-linking of CD4 and CD8 with the T-cell receptor complex: quaternary complex formation and T-cell repertoire selection. *Immunol. Today*, 9: 121-124, 1988.
25. Feldman M.: T-cell activation in health and disease. *Immunol. Today*, 9: 121-124, 1988.
26. Fleisher B., Schrezenmeier H.: Do CD4 or CD8 molecules provide a regulatory signal in T-cell activation? *Immunol. Today*, 9: 132-133, 1988.
27. Fowlkes B.J., Schwartz R.H., Pardoll D.M.: Deletion of self-reactive thymocytes occurs at CD4+8+ precursor stage. *Nature*, 334: 620-623, 1988.
28. Gebel H.M., Anderson J.E., Gottschalk L.R., Bray R.A.: Determination of helper-suppressor T-cell ratios. *New England J. Med.*, 316: 113, 1987.
29. Giorda R., Trucco M.: Mouse NKR-P1: a family of genes selectively co-expressed in A-LAK cells. *J. Immunol.*, 147: 1701-1708, 1991.
30. Gupta S.: Subpopulation of CD4+(T4+) in homosexual, bisexual men with persistent generalized lymphadenopathy. *Clin. exp. Immunol.*, 71: 8-12, 1987.
31. Hansel T.T.: Leucocyte typing-OKCD? *Lancet*, 2: 1382-1383, 1987.
32. Harnett M., Rigley K.: The role of G-proteins versus protein tyrosine kinases in the regulation of lymphocyte activation. *Immunol. Today*, 13: 482-486, 1992.
33. Heberman R.B., Hiserodt J., Vujanovic N., Balch C., Lotzova E., Bolhuis R., Golub S., Lanier L.L., Phillips J.H., Riccardi C., Ritz J., Santoni A., Schmidt R.E., Uchida A.: Lymphokine-activated cell activity. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol. Today*, 8: 178-181, 1987.
34. Hercend T., Schmidt R.E.: Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunol. Today*, 9: 291-293, 1988.

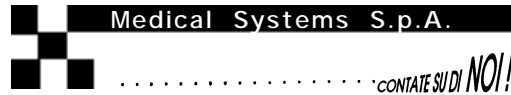
35. Janeway C.A. Jr: Accessories or coreceptors? *Nature*, 335: 208-210, 1988.
36. Janeway C.A. Jr., Jones B., Hayday A.: Specificity and function of T cells bearing receptors. *Immunol. Today*, 9: 73-75, 1988.
37. Jondal M.: The human NK cell - a short over-view and an hypothesis on NK recognition. *Clin. exp. Immunol.*, 70: 255-262, 1987.
38. Kingsley G., Pitzalis C., Waugh A.P., Panayi G.S.: Correlation of immunoregulatory function with cell phenotype in cord blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 73: 40-45, 1988.
39. Kourilski P., Chaouat G., Roubourdin-Combe C., Claverie J.M.: Working principles in the immune system implied by the "peptide self" model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 3400-3404, 1987.
40. Lanier L.L., Le A.M., Phillips J.H., Warner N.L., Babcock G.F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu 11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.*, 131: 1789-1796, 1983.
41. Lanier L.L., Loken M.R.: Human lymphocyte subpopulation identified by using three-colour immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu 3, Leu 7, Leu 8, and Leu 11 cell surface antigen expression. *J. Immunol.*, 132: 151-156, 1984.
42. Lanier L.L., Le A.M., Ding A., Evans A.L., Krensky A.M., Clayberger C., Phillips J.H.: Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL2- dependent cytotoxic and non cytotoxic T-cell lines. *J. Immunol.*, 138: 2019-2023, 1987.
43. Lanier L.L., Spits H., Phillips J.H.: The developmental relationship between NK cells and Tcells. *immunol. Today*, 13: 392-395, 1992.
44. Maddon P.J., Dagleish A.G., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A., Axel R.: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, 47:333-348, 1986.
45. Maggi E., Parronchi P., Manetti R., Simonelli C., Piccinni M. P., Santoni Ruggiu F., De Carli M., Ricci M., Romagnani S.: Reciprocal regulatory role of IFN- and IL-4 on the in vitro development of human TH1 and TH2 clones. *J. Immunol.*, 148: 2142-2147, 1992.
46. Male D., Champion B., Cook A.: *Immunologie: Le systeme immunitaire et sa regulation*. Medsi/McGraw-Hill, Paris, 1988.
47. Martin R.H., Calabi F., Millstein C.: Isolation of CD1 genes: a family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens. *PNAS*, 83: 9154-9158, 1986.
48. Marrack P., Kappler J.: The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol. Today*, 9: 308-315, 1988.
49. Matis L.A., Cron R., Bluestone J.A.: Major histocompatibility complex-linked specificity of receptor-bearing T lymphocytes. *Nature*, 330: 262-264, 1987.
50. Matsumura Y., Tarin D.: Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet*, 340: 1053-1058, 1992
51. Modlin R.L., Brenner M.B., Krangel M.S., Duby A.D., Bloom B.R.: T cell receptor of human suppressor cells. *Nature*, 329: 541-544, 1987.

52. Moretta e al.: PNAS 84: 1654, 1987 (citato da Strominger J.L. 1989).
53. Moretta L., Ciccone E., Moretta A., Höglund P., Öhlen C., Karre K.: Allorecognition by NK cells: nonself or no self? Immunol. Today, 13: 300-306, 1992.
54. Moretta L., Pende D., Cozzani R., Merli A., Bagnasco M., Mingari M.C.: T cell nature of some lymphokine-activated killer (LAK) cells. Frequency analysis of LAK precursors within human T cell populations and clonal analysis of LAK cells. Eur. J. Immunol., 16: 1623-1627, 1986.
55. Morimoto C., Letvin N.L., Boyd A.W., Hagan M., Brown H.M., Kornacki M.M., Schlossman S.F.: The isolation and characterization of the human helper inducer T cells subset. J. Immunol., 134: 3762-3769, 1985a.
56. Morimoto C., Letvin N.L., Distaso J.A., Aldrich W.R., Schlossman S.F.: The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cells subset. J. Immunol., 134: 1508-1515, 1985b.
57. Mosman T. R., Cherwinsky H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L.: Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol., 136: 2348-2357, 1986.
58. Ortaldo J.R.: Human cytotoxic effector cells: definition and analysis of activity. Immunol. Clin., 7: 67-86, 1988.
59. Perussia B., Trinchieri G., Jackson A., Warner N.L., Faust J., Rumpold H., Kraft D., Lanier L.L.: The Fc receptor for IgG human natural killer cells: phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. J. Immunol., 133: 180-189, 1984.
60. Peterson A., Seed B.: Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. Cell, 54: 28-33, 1988.
61. Polli N., Matutes E. Robinson D., Catovsky D.: Morphological heterogeneity of Leu 7, Leu 11 and OKM1 positive lymphocyte subsets: an ultrastructural study with the immunogold method. Clin exp. Immunol., 68: 331-339, 1987.
62. Porcelli S., Brenner M.B., Band H: Biology of the human T cell receptor. Immunol. Rev., 120: 137-183, 1991.
63. Powrie F., Mason D: Phenotypic and functional heterogeneity of CD4+ T cells. Immunol. Today, 9: 274-277, 1988.
64. Raullet D.H.: Antigens for T cells. Nature, 339: 342-343, 1989.
65. Raullet D.H., Spencer D.M., Hsiang Y.H., Goldman J.P., Bix M., Liao N.S., Zijlstra M., Jaenisch R., Correa J.: Control of T-cell development. Immunol. Rev., 120: 185-204, 1991.
66. Reinherz E.L.: T-cell receptors. Who needs more? Nature, 325: 660-663, 1987.
67. Reynolds C.W., Ortaldo J.R.: Natural killer activity: the definition of a function rather than a cell type. Immunol. Today, 8: 172-174, 1987.
68. Romagnani S.: Human TH1 and TH2 subsets: Regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. Int. Arch. Immunol., 98: 279-285, 1992.

69. Romagnani S.: Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the “natural” immune response? *Immunol. Today*, 13: 379-381, 1992.
70. Rudd C.E.: A functional dichotomy in CD4⁺T lymphocytes. *Immunol. Today*, 9: 367-368, 1988.
71. Rudd C. E., Anderson P., Morimoto C., Streuli M., Schlossman S. F.: Molecular interactions, T-cell subset and a role of the CD4/CD8: p56^{lck} complex in human T-cell activation. *Immunol. Rev.*, 111: 225-266, 1989.
72. Shaw S.: Characterization of human leucocytes differentiation antigens. *Immunol. Today*, 8: 1-3, 1987.
73. Smith K.A.: The two chain structure of high-affinity IL-2 receptors. *Immunol. Today*, 8-11-13, 1987.
74. Srour E.F., Walker E.B., Walker D.E., Jansen J.: Functional and phenotypical studies of the Leu 4 (CD3)⁺, Leu 1 (CD5)⁻ T lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.*, 73: 34-39, 1988.
75. Strominger J.L.: Developmental biology of the T cell receptor. *Science*, 244: 943-954, 1989.
76. Teh H.S., Kisielow P., Scott B., Kishi H., Uematsu Y., Bluethmann H., Von Boehmer H.: Thymic major histocompatibility complex antigens and the T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 335: 229-233, 1988.
77. Tsubota H., Lord C.I., Watkins D.I., Morimoto C., Letvin N.L.: A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J. exp. Med.*, 169: 1421-1434, 1989.
78. Vuillier F., Lapresle C., Dighiero G.: Comparative analysis of CD4-4B4 and CD4-2H4 lymphocytes subpopulations in HIV negative homosexual, HIV seropositive and healthy subjects. *Clin. exp. Immunol.*, 71: 8-12, 1988.
79. Versteeg R.: NK cells and T cells: mirror images? *Immunol. Today*, 13: 244-247, 1992.
80. Weiss A., Imboden J.B.: Cell surface molecules and early events in human T lymphocytes activation. *Advanc. Immunol.*, 41: 1-38, 1987.
81. Young J.D.E., Lin C.C.: Multiple mechanisms of lymphocytes-mediated killing. *Immunol. Today*, 9: 140-144, 1988.
82. Young J.D.E., Cohn Z.A.: Come agiscono le cellule “killer”. *Le Scienze*, 235: 28-34, 1988.
83. Yanagi Y., Yoshikai Y., Leggett K., Clark S.P., Aleksander I., Mak T.W.: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*, 308: 145-149, 1984.
84. Zambello R., Trentin L., Siviero F., Pezzutto A., Semenzato G.: I cluster di designazione dei linfociti. *Immunol. Clin. Sper.*, 6:25-42, 1987.
85. Zola H.: The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol. Today*, 8: 308-315, 1987.

 4.5.2. Funzioni immunoregatorie dei subsets TH1 e TH2	“
41	A .
Subset TH1	“ 41
B. Subset TH2	“
424.6. Funzione T citotossica	“
43	4.6.1.
Maturazione funzionale delle CTL	“ 43
4.6.2. Meccanismo della citolisi	“
44 4.7. Funzione T soppressiva	“
45	4.7.1. I
principali circuiti soppressivi.....	“ 46
 4.7.2. I fattori della soppressione	“
47	4.7.3. I
meccanismi della soppressione	“ 48
4.7.4. Modelli interpretativi	“
49	5. Funzioni delle Cellule T con Recettore “ 51
	6. Distribuzione dei Linfociti T negli Organi Linfoidi Periferici “ 53
	7. Altri Recettori di Superficie dei Linfociti T.....	“ 54
	7.1. L'antigene CD1.....	“ 54
	7.2. L'antigene CD2.....	“ 56
	7.3. L'antigene CD7.....	“ 57
	7.4. L'antigene CD28.....	“ 57
	7.5. L'antigene LFA-1 “ 58
	7.6. L'antigene CD44.....	“ 59
	7.7. Altri recettori “ 60
	8. Sottopopolazioni T Linfocitarie.....	“ 63
I Linfociti NK	“ 65
	9. Caratteri Generali.....	“ 65
	10. I Recettori di Riconoscimento “ 69
	10.1. Recettore CD16.....	“ 69
	10.2. Recettori NK-R “ 70
	11. Target e Molecole Protettive.....	“ 72
	11.1. Molecole target.....	“ 72
	11.2. Molecole protettive.....	“ 72
	12. Repertorio e Origine delle Cellule NK “ 74
	13. I Marcatori di Superficie.....	“ 76
	13.1. Cellule K.....	“ 76
	13.2. Cellule NK.....	“ 76
	13.3. Cellule LAK “ 77
	14. Sottopopolazioni delle Cellule NK “ 78
	15. Funzioni delle Cellule NK.....	“ 79
	16. Principali Marcatori delle Cellule NK.....	“ 81
Bibliografia	“ 83
Indice	“ 88

Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana



1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna, Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovario*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La b-endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.

72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.



Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 11, numero 79

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
☎ Tel.-Fax 079 270464

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

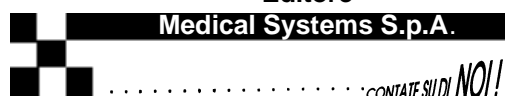
Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandepieno
Giuseppe Gambetta

Editore



Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
% Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed., - Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - ☎ Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Aprile 1993
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)