

REUMATISMO

Giornale ufficiale della Società Italiana di Reumatologia

I marcatori linfocitari

U. FIOCCO

Estratto dal Volume 44, 1 - 1992

I marcatori linfocitari

U. FIOCCO

In condizioni fisiologiche la stimolazione di linfociti di derivazione timica (T) da parte di peptidi antigenici (Ag) associati alle molecole «self» del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) dà origine a cellule T attivate e differenziate, con funzioni effettrici geneticamente determinate.

Tali funzioni includono la secrezione di citochine ad attività immunoregolatrice e la lisi specifica di cellule bersaglio, svolte rispettivamente da linfociti T-helper (Th) e T-citotossici (CTL).

La conoscenza dei T-linfociti ha compiuto vent'anni. La loro separazione dalle altre classi di linfociti, morfologicamente indistinguibili, si è resa possibile con l'individuazione di marcatori di membrana specifici della linea T. I primi sono stati gli Ag ϑ (Thy) del topo, definiti da alloantisieri (prodotti da animali differenti della stessa specie) indotti in ceppi singenici (stesso aplotipo MHC) immunizzati con timociti (12). Nell'uomo la separazione delle cellule T è stata ottenuta inizialmente utilizzando i recettori per i globuli rossi di pecora (E), con la formazione di rosette spontanee (18). Precoce ed altrettanto rilevante è stata l'osservazione di una eterogeneità fenotipica e funzionale delle cellule T. Infatti, frazioni cellulari con marcatori di superficie diversi hanno dimostrato capacità funzionali distinte. Nell'uomo le prime frazioni funzionali, messe in evidenza in base ai recettori $Fc\gamma$ (TG) ed $FC\mu$ (TM) delle immunoglobuline (Ig), hanno compreso rispettivamente cellule Th e T soppressori (Ts) (8). L'introduzione degli anticorpi monoclonali (mAb) prodotti da ibridomi che derivano dalla fusione di B-linfociti presensibilizzati con cellule di mieloma (7), grazie alla loro uniforme specificità ed omogeneità chimica, ha permesso di identificare marcatori linfocitari legati allo stadio maturativo di differenziazione ed allo stato di attivazione delle cellule-T (13).

La distinzione delle cellule T in sottopopolazioni funzionali in relazione ai marcatori di superficie è stimolante ai fini pratici, ma non priva di limitazioni. Le strutture antigeniche di membrana possono infatti non essere direttamente coinvolte nelle attività funzionali che si stanno ricercando e la loro espressione può variare con l'attivazione e la differenziazione cellulare. Inoltre — fatto più rilevante — le attività funzionali attribuite ad una frazione sono spesso svolte solo da una parte delle cellule che esprimono un determinato marcatore.

Dai primi anni ottanta, per l'esigenza di mettere ordine nel grande numero di molecole di superficie fino ad allora definite dagli mAb originari, è stata introdotta una nomenclatura unificata.

Una struttura molecolare della superficie cellulare, quando viene riconosciuta da almeno due diversi mAb diretti verso epitopi anche distinti della stessa struttura, caratterizza un gruppo di differenziamento che viene denominato «CD» (cluster of differentiation) seguito da un numero arabo (6).

Nel corso dell'ultimo «Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens» (Vienna, 1989) sono stati esaminati 1100 mAb e definiti complessivamente 78 «CD». Inizialmente si è considerato rilevante un Ag in quanto marcatore di una specifica linea cellulare, ed i primi «CD» sono stati impiegati per definire la linea delle cellule T (CD1; CD2; CD3; CD4; CD5...). Ora invece l'interesse prevalente è rivolto alle molecole espresse da più linee cellulari.

La maggior parte delle molecole di superficie caratterizzate fino ad oggi, è data da «proteine integrali» di membrana, montate attraverso il bilayer fosfolipidico ed in grado di mediare le funzioni cellulari mediante complesse interazioni (6).

Esse si possono suddividere in base al tipo di interazione funzionale nota secondo lo schema seguente (4):

Molecole di adesione specifiche

- MHC di classe I e II
- TCR

Molecole di adesione non specifiche

- per Ag MHC di classe I e II (CD4, CD8)
- per cellule e matrice extracellulare (ECM) (integrine, CD2, CD44, ecc.)
- recettori di ricircolazione, «homing receptors» (LAM-1)

Recettori

- per l'Fc delle Ig (CD16, CD32)
- per il complemento (CD11b, CD35)
- per le linfochine (CD25, CD40, ecc.)
- per i fattori di crescita (CD5, CD27, CD28, ecc.)
- per i virus (CD4, CD54)
- per il trasporto di molecole (CD71)

Enzimi di membrana

- (CD26, CD45RA, ecc.).

L'introduzione delle metodiche di biologia molecolare ha rapidamente migliorato la capacità di collegare gli Ag «CD» ai geni corrispondenti. Infatti le sequenze del DNA complementare (cDNA) forniscono importanti informazioni sulla struttura delle molecole, permettendo la definizione della sequenza primaria (sequenza aminoacidica), dell'arrangiamento genico (ricombinazione dei geni che codificano la molecola) e della loro localizzazione cromosomica (6).

Con la definizione della struttura molecolare è risultata evidente la notevole complessità di alcune molecole di membrana. Essa può derivare dalla condivisione di subunità comuni, come la catena

β 1 (CD29) per le molecole di adesione VLA 1-6 (CD49) della famiglia delle integrine (16), oppure dalla trascrizione di un gene in diverse sequenze polipeptidiche, come le isoforme CD45RA e CD45RO dell'LCA T200, espresse rispettivamente da cellule T «naive» (vergini) e «memory» (presensibilizzate) (15).

La capacità di mantenere cloni Ag specifici in coltura a lungo termine e la definizione della struttura formata dal recettore T per l'Ag e dal complesso CD3 (TCR-CD3) ha permesso di definire le basi molecolari del riconoscimento dell'Ag e dell'attivazione cellulare.

Lo studio dell'organizzazione dei geni TCR permette poi di stabilire la natura mono/policonale e lo stadio differenziativo di una popolazione cellulare (2). L'analisi genotipica, oppure quella fenotipica con mAb per i determinanti delle regioni variabili del TCR (V), è utile per ricercare l'esistenza di repertori ristretti (condivisione delle regioni V dei TCR di cellule T) nelle malattie autoimmuni (3).

Sono dette molecole accessorie altre proteine integrali di membrana, oltre al TCR-CD3, con un ruolo significativo nel riconoscimento dell'Ag e nell'attivazione della cellula T (CD2; CD4; CD8; CD11a/CD18; CD29/CD49; CD45, ecc.) (4). Esse rappresentano strutture non polimorfiche, spesso con omologia strutturale per la superfamiglia delle Ig, che interagiscono con ligandi selettivi sulla superficie di altre cellule. La loro azione consiste nell'incrementare l'adesione cellula-cellula e nella trasduzione di segnali di attivazione. Il termine accessorie si riferisce alla capacità di fornire il «II» segnale per l'attivazione della cellula T (1, 14).

L'espressione ed affinità di legame delle molecole accessorie viene regolata dalla stimolazione del TCR e dalle citochine (1). Gli mAb relativi alle molecole accessorie sono in grado di bloccare la risposta all'AG e vengono quindi impiegati come «sonde» per valutare il ruolo fisiologico di queste molecole nelle risposte funzionali, oltre che per studiarne l'espressione come marcatori fenotipici (4). Nei confronti dell'attivazione della cellula T, le molecole accessorie si possono suddividere in recettori per segnali di attivazione primari (TCR-CD3; CD2; Th1) e recettori per segnali accessori per il TCR, che richiedono stimoli esogeni per l'attivazione (CD4; CD8; CD5; CD7; CD26; CD28; ecc.) (1).

I CD4 e CD8 rappresentano molecole accessorie con proprietà di adesione specializzata per determinanti non polimorfici delle molecole MHC, rispettivamente di classe II e I. Esse sono inoltre in grado di trasdurre segnali di attivazione poiché sono associate ad una tirosinchinasi endocellulare (1, 14). La risposta all'Ag-MHC del T-linfocita, meglio nota per i Th, consiste in una serie di eventi cellulari collettivamente definiti come fase di attivazione della cellula e suddivisi nelle seguenti tappe:

- a) trasduzione di segnali;
- b) trascrizione di nuovi geni;
- c) espressione di nuove molecole.

Da questi eventi deriva la risposta funzionale e proliferativa dei T-linfociti (1).

La natura di una risposta immune ad un Ag è determinata dalle classi funzionali di linfociti che risultano attivati. Dati recenti suggeriscono che la regolazione delle funzioni effettrici venga svolta dalle varie sottoclassi di cellule T, attraverso la secrezione differenziata di citochine (9).

Fenotipi di membrana complessi, definiti in base all'espressione delle molecole accessorie, hanno permesso di distinguere cellule T preattivate verso specifiche vie differenziative (ad. es. CD4 + CD29 + CD45RO + o Th memory) (9, 15). Le molecole accessorie/di adesione appaiono in grado di intervenire a livello delle funzioni effettrici delle cellule T mediando sia l'attivazione in risposta a particolari stimoli, sia la migrazione ed il posizionamento nelle sedi della risposta immune (9).

Per quanto riguarda le malattie reumatiche risulta di notevole interesse lo studio delle interazioni tra cellule T ed endotelio vascolare e della rispettiva espressione di molecole accessorie/di adesione, in stretta connessione con il network delle citochine (11, 19).

Il ruolo regolatorio di tali molecole sembra mediato dal tipo di fosforilazione e di trascrizione di geni per alcune linfocine (14).

I fenotipi ristretti di produzione di linfocine (produzione di gruppi distinti di linfocine per sottoclassi di cellule T) da poco descritti per frazioni di Th, sia nel topo (Th1, Th2) che nell'uomo (naive, memory), sono correlati agli stadi di differenziazione delle cellule Th, che si osservano a seguito di ripetute stimolazioni in corso di reazioni infiammatorie croniche (9, 15).

Tutto ciò contrasta con la concezione di una rigida associazione fenotipo-funzione e con la conseguente compartimentalizzazione del sistema immunitario che si è andata diffondendo in seguito all'introduzione delle metodiche citofluorimetriche per il dosaggio dei marcatori di membrana (17).

Identificare i TCD4 con i Th oppure TCD8 con i Ts/CTL è pertanto inesatto. L'eterogeneità funzionale delle cellule T appare infatti più complessa e viene dimostrata da diverse evidenze sperimentali quali la capacità CTL dei T-CD4, la presenza di cloni T bifunzionali con attività (Th/Ts) regolata dalle caratteristiche del bersaglio Ag e le attività regolatrici reciproche di alcune linfocine (IL-10, TGF, INF γ , ecc.) (10).

L'approccio attuale riguardante la relazione fenotipo-funzione dei marcatori linfocitari deriva dalla caratterizzazione strutturale e funzionale delle molecole di superficie e dalla possibilità di scomporre le principali funzioni delle cellule T in diversi stadi, ognuno dei quali direttamente valutabile (espressione di Ag di membrana, sintesi del DNA, flusso del Ca, produzione di citochine).

La precisa definizione del ruolo di una struttura molecolare nella funzione di una cellula T va acquistando una particolare rilevanza clinica nella ricerca di precisi bersagli per l'immunoterapia specifica delle malattie reumatiche (5).

Bibliografia

1. ALTMAN A., COGGESHALL K.M., MUSTELIN T.: Molecular events mediating T cell activation. *Adv. Immunol.* **48**: 227, 1990.
2. ASHWELL J.D.: Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 139, 1990.
3. BROSTOFF S.W., HOWELL M.: T cell receptors, Immunoregulation and Autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **60**: 1, 1992.
4. HOREJSI V.: Surface antigens of human leukocytes. *Adv. Immunol.* **49**: 75, 1991.
5. KINGSLEY G., PANAYI G., LANCHBURY J.: Immunotherapy of the rheumatic diseases - practice and prospects. *Immunol. Today* **12**: 177, 1991.
6. KNAPP W.: Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford Univ. Press, Oxford, 1989.
7. KOHLER G., MILSTEIN C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495, 1975.
8. MORETTA L., WEBB S.R., GROSSI C.E., LYDYARD P.M. COOPER M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM (T μ) or IgG (T γ). *J. Exp. Med.* **146**: 184, 1977.
9. MOSMANN T.R., COFFMAN R.L.: Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* **46**: 111, 1989.
10. NAOR D.: A different outlook at the phenotype-function relationship of the T cell subpopulations: fundamental and clinical implications. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**: 127, 1992.
11. POBER J.S., COTRAN R.S.: Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv. Immunol.* **50**: 261, 1991.
12. RAFF M.C.: Surface antigen markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice. *Transplant. Rev.* **6**: 52, 1971.
13. REINHERZ E.L., SCHLOSSMAN S.F.: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* **19**: 821, 1980.
14. RUDD C.E., ANDERSON P., MORIMOTO C., STREULI M., SCHLOSSMAN S.F.: Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8:p56lck complex in human T-cell activation. *Immunol. Rev.* **11**: 224, 1989.
15. SANDERS M.E., MAKGOPA M.W., SHAW S.: Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol. Today* **9**: 195, 1988.
16. SPRINGER A.T.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425, 1990.
17. WESTERMANN J., PABST R.: Lymphocyte subsets in the blood: diagnostic window on the lymphoid system?. *Immunol. Today* **11**: 406, 1990.
18. WYBRAN J., CARR M.C., FUDENBERG H.H.: The human rosette-forming cell as marker of a population of thymus-derived cells. *J. Clin. Invest.* **51**: 2537, 1972.
19. ZIFF M.: Role of endothelium in chronic inflammatory synovitis. *Arthritis and Rheum.* **34**: 1345, 1991.