

Marcatori di danno cellulare linfocitario e loro possibili applicazioni in ambito biomedico-diagnostico

Riccardo Ientile

Dipartimento di Scienze Biochimiche, Fisiologiche e della Nutrizione, Università di Messina, Policlinico Universitario, Messina

ABSTRACT

Biomarkers of lymphocyte damage and their possible clinical application. Mature T cells are long-lived cells that are maintained through continuous contact with exogenous ligands and certain cytokines. However, after leaving the thymus as naïve cells, T cells can survive for prolonged periods as re-circulating resting cells. The mitogen-stimulated cultures of lymphocytes can be used as a model system to study biochemical changes that may be associated to alterations in proliferative phases of the cell cycle. This state of immune/proliferative activation makes cells more susceptible to mitogen-induced apoptosis. Evidence for changes in the levels of some biomarkers related to perturbations of lymphocyte proliferative homeostasis leading to programmed cell death is reported in this review. Some of these results are relevant in the chronic HIV infection and in cell response to alterations in oxidative status. Indeed, alterations in the expression of cell cycle-related proteins are consistently observed in CD4 and CD8 cells from HIV-infected patients after in vitro mitogenic stimulation. Furthermore, senescence is associated with progressive decline in immune functions, which is assigned in part to increased apoptosis. Recent results demonstrate that the nuclear factor (NF)- κ B is one of the transcription factor that play an important role in the regulation of immune response genes. The activation of NF- κ B pathway has been shown to inhibit apoptosis in human lymphocytes. Thereby, defects in NF- κ B signaling pathway appear to be responsible for increased tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in lymphocytes from aged humans. These findings may provide valuable information for evaluating a link between the perturbation of lymphocyte proliferative homeostasis and the activation of apoptotic machinery.

INTRODUZIONE

La molteplicità di interessi che ha da sempre suscitato lo studio delle popolazioni e delle sottopopolazioni linfocitarie è legata alla possibilità di reperire, in maniera relativamente semplice, queste cellule dal sangue periferico e mantenerle in coltura per un adeguato periodo di tempo. Tutto ciò supera le osservazioni a carattere specificamente immunologico o definite nell'ambito delle conoscenze dell'immunologia di base e dell'immunologia clinica e si caratterizza per valutazioni di interesse interdisciplinare, che possono trovare applicazione nell'ambito della Medicina di Laboratorio. Risultati sperimentali legati alla possibilità della produzione in vitro di cloni e di linee T linfocitarie hanno consentito il conseguimento di chiare evidenze anche grazie all'uso della citofluorimetria o all'impiego di anticorpi monoclonali.

In questo ambito, numerosi risultati hanno determinato l'acquisizione di conoscenze che riguardano direttamente: 1) la complessa organizzazione del sistema immunitario e il ruolo specifico che in essa svolge ciascuna cellula "immunologica", nelle sue diverse tappe di sviluppo; 2) lo scambio di segnali tra cellula e cellula, che si realizza attraverso molecole espresse sulla membrana (marcatori di superficie) che in maniera diversa interagiscono con differenti mediatori chimici e ligandi; 3) la caratterizzazione di specifici marcatori di membrana adatti a definire un particolare ruolo funzionale dei differenti tipi cellulari e la funzione immunologica; 4) il possibile impiego terapeutico di molecole che hanno come

bersaglio i linfociti nei diversi ambiti della patologia; 5) le modificazioni della risposta cellulare in diversi quadri patologici associati a condizioni particolari di alcune popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie. Evidenze di queste caratteristiche condizioni si riscontrano ad esempio nell'infezione da HIV, dove la riduzione della quota dei linfociti CD4 e l'inversione del rapporto CD4/CD8 assumono rilievo diagnostico e prognostico, o nella persistenza di stimoli proliferativi cui si assiste nell'invecchiamento.

In questo contesto, la caratterizzazione dei fenomeni del "signalling" cellulare e delle attività che determinano una evidente modificazione dei livelli di proteine, che si accompagnano alla risposta cellulare, rappresenta un utile strumento nella comprensione di alcuni fenomeni così come nello sviluppo di nuovi biomarcatori delle diverse condizioni fisiopatologiche.

Le cellule T mature sono cellule a lunga vita sostenute da un continuo contatto con ligandi esogeni e alcune citochine. Infatti, dopo avere lasciato il timo come cellule T "naïve", possono sopravvivere per tempi lunghi come cellule "resting" circolanti. Colture di linfociti stimolate con mitogeni possono essere usate come modelli per studiare i cambiamenti biochimici che possono essere associati ad alterazioni del ciclo cellulare. Questo stato di attivazione immuno/proliferativo rende le cellule più suscettibili all'apoptosi indotta da mitogeni. Di seguito vengono riportate alcune evidenze sui cambiamenti dei livelli di alcuni biomarcatori correlati alle perturbazioni nell'omeostasi proliferativa dei linfociti, che conducono

alla morte cellulare programmata. Alcuni di questi risultati sono rilevanti nell'infezione cronica da HIV e nella risposta cellulare conseguente all'alterazione dello stato ossidativo. Infatti, dopo stimolazione mitogenica, le alterazioni nell'espressione delle proteine del ciclo cellulare sono consistenti nelle cellule CD4 e CD8 dei pazienti HIV+.

Inoltre, la senescenza è associata ad un declino progressivo della funzione immunitaria, dovuto in parte all'incremento dell'apoptosi. Risultati recenti mostrano che il fattore nucleare (NF)- κ B è uno dei fattori di trascrizione che giocano un importante ruolo nella regolazione genica della risposta immunitaria. È stato visto che l'attivazione di NF- κ B inibisce l'apoptosi nei linfociti umani. Pertanto, difetti nel "signalling" di NF- κ B sembrano essere responsabili dell'incremento dell'apoptosi indotta dal "tumor necrosis factor" (TNF)- α in linfociti umani invecchiati. Questi dati potrebbero fornire informazioni utili per valutare il collegamento tra alterazioni del ciclo cellulare e attivazione del sistema apoptotico.

LA RISPOSTA CELLULARE

L'attivazione dei linfociti T è notoriamente cruciale per lo sviluppo di reazioni immuni, essa richiede un contatto fisico tra cellule T e cellule che presentano l'antigene (APC). Poiché queste cellule sono inizialmente localizzate in posizioni distinte dell'organismo, esse migrano e il contatto si stabilisce all'interno degli organi linfoidi secondari. Il contatto tra le cellule deve mantenersi per un tempo utile affinché si generi un meccanismo di "signalling". Pertanto, interazioni cellulari in tempi più o meno lunghi sono in grado di modificare l'attività cellulare in risposta a determinate condizioni fisiopatologiche. Per questo motivo è utile trovare una correlazione tra modificazioni cellulari e stato di malattia.

Un modo classico per illustrare la risposta immunitaria si riferisce fondamentalmente a due meccanismi: uno prevede la formazione di anticorpi (risposta umorale) e l'altro la risposta cellulo-mediata (reazioni tissutali). I due aspetti della risposta immunitaria sono solo apparentemente distinti, ognuno di essi è parte di un sistema continuo di risposte e le cellule e gli eventi implicati in una risposta possono sovrapporsi a quelli dell'altra.

Tutti i fenomeni che esamineremo sono il risultato di eventi che accadono dentro e sulle cellule. Il tipo cellulare più utilizzato nello studio dei meccanismi della risposta immunitaria è il linfocita. Si ritiene generalmente che le cellule progenitrici migrino dal midollo osseo, via sangue, al timo. Quando giungono al sito anatomico di elezione subiscono l'azione di vari fattori ormono-simili. Le cellule progenitrici vanno allora incontro a cambiamenti differenziativi che le rendono linfociti riconoscibili morfologicamente.

Gli organi in cui le cellule progenitrici diventano linfociti e che contengono linfociti identificabili, ma prevalentemente non funzionali, sono detti organi linfoidi primari (timo e midollo osseo). Al termine delle fasi del differenziamento, che si svolgono negli organi linfoidi primari, i diversi tipi di linfociti raggiungono la periferia tramite la

circolazione sanguigna e linfatica e si installano in modo stabile negli organi linfoidi secondari. Il sistema linfatico costituito dai vasi e dai gangli linfatici forma una rete parallela al sistema sanguigno.

I linfociti lasciano gli organi linfoidi primari e si insediano negli organi linfoidi secondari, dove divengono funzionali (milza, linfonodi). Gli organi secondari contengono un insieme di linfociti timo-derivati con disposizioni riconoscibili, ma cosa più importante, i linfociti del tessuto linfoide secondario sono in grado di svolgere funzioni immunitarie.

I linfociti rappresentano il 30% dei tipi cellulari che derivano dalla differenziazione dei globuli bianchi; ad essi sono affidati tutti i meccanismi specifici del sistema immunitario. Si distinguono due grandi categorie di linfociti, quelli di tipo B ("bone marrow") e quelli di tipo T (timo). I linfociti B e T benché quasi identici dal punto di vista morfologico hanno funzioni assai differenti. I linfociti B sintetizzano anticorpi, le immunoglobuline, che vengono espresse sulla loro superficie. Il legame di questi con specifici antigeni induce il differenziamento dei linfociti B in plasmociti. I linfociti T, a loro volta, portano recettori T, i quali riconoscono gli antigeni a condizione che siano correttamente presentati. In questo processo evolutivo di differenziamento possono raggiungere una attività citotossica. Questa capacità è il risultato di un complesso meccanismo di interazione con antigeni che vengono correttamente presentati da una cellula infetta. Quando un linfocita T arriva quasi al termine della propria maturazione, diventa capace di interagire con gli antigeni del sé, presenti nel timo. I linfociti che hanno una forte affinità nei confronti di questi antigeni vengono eliminati per apoptosi. Attraverso questo setaccio passano solo i linfociti T che hanno una affinità scarsa per gli antigeni del sé. Gli antigeni vengono dapprima inglobati da una cellula deputata alla loro presentazione, per es. un macrofago. All'interno della cellula la proteina viene tagliata in peptidi, poi questi peptidi sono affidati a molecole del complesso di istocompatibilità presente sulla superficie cellulare.

Quelli con scarsa affinità subiscono una definitiva fase di differenziamento: solo i linfociti T in corso di maturazione che portano i recettori capaci di riconoscere gli antigeni presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità vengono promossi ed entrano nel ciclo di differenziamento che porta alla loro specializzazione in linfociti CD4 o CD8, gli altri linfociti scompaiono. In questo contesto il sistema "linfocita" interagisce con l'ambiente della matrice extracellulare e costituisce un elemento utile per studiare gli effetti determinati da effettori extracellulari che possono interagire sviluppando meccanismi che interessano recettori, trasduzione di segnale, risposta cellulare.

LINFOCITI T IN VITRO

Un mezzo comunemente usato ed estremamente valido per distinguere le cellule B dalle T è costituito dalle rispose differenziate a varie sostanze che inducono la proliferazione. Queste sostanze sono dette mitogeni.

Un mitogeno è una sostanza che induce una cellula ad entrare in mitosi. Poiché la mitosi implica la produzione di nuovo DNA e l'attivazione di meccanismi proliferativi, una ragionevole valutazione di questa si ottiene misurando l'entità della sintesi del DNA.

All'inizio degli anni '60 fu osservato che lectine, isolate da alcuni tipi di piante, inducevano nelle popolazioni linfocitarie la trasformazione in blasti. I blasti sono linfociti grandi, metabolicamente attivi, la cui presenza è indice di una intensa attività cellulare. C'è una stretta correlazione tra l'entità della blastogenesi (numero di blasti formati dopo trattamento) e incorporazione di timidina triziata nel DNA. Poiché l'incorporazione di radionuclidi è un metodo più facile e più quantitativo dell'esame microscopico di preparati colorati, esso è stato usato quasi universalmente per determinare se una sostanza è mitogenica. Alcuni dei mitogeni più comunemente usati sono: fitoemagglutina, concanavalina A, fitolacca americana e lipopolisaccaride batterico. Tutte queste sostanze (e molte altre) se aggiunte a colture di milza, linfonodo, timo o sangue periferico inducono una intensa attività mitogenica.

Tuttavia, un fenomeno forse più importante della proliferazione e che ha un ruolo cruciale nella differenziazione e nel modellamento del compartimento linfocitario è rappresentato dall'apoptosi. La cellula riceve continuamente segnali di suicidio e segnali di sopravvivenza. I segnali di suicidio indicano una situazione di stress o il "binding" di agonisti sul recettore Fas. All'interno della cellula le diverse fasi della catena delle risposte possono essere attivate o inibite. Così la modificazione dei livelli intracellulari di alcune molecole rappresenta l'attivazione di un meccanismo di morte programmata o di sopravvivenza, ad es. Bax è un attivatore del suicidio

della cellula, mentre Bcl2 è un inibitore. La proteina "apoptosis-inducing factor" (AIF) è un fattore che induce apoptosi. Gli esecutori effettivi sembrano essere le caspasi che possono essere tra l'altro attivate dai radicali liberi dell'ossigeno (Figura 1).

Alcuni processi relativi allo sviluppo dell'apoptosi sembrano essere un evento programmato. Tra i fattori che inducono apoptosi molti interagiscono con strutture di membrana, altri, come alcuni ormoni, interagiscono con recettori a livello nucleare attivando la trascrizione di geni che sono collegati con l'induzione del processo di morte cellulare programmata. L'apoptosi può svilupparsi dopo la perdita di segnali trofici che sopprimono normalmente l'espressione di proteine del programma di morte cellulare. Numerose citochine, ormoni ed altri stimoli esterni impediscono l'apoptosi; questi "fattori di sopravvivenza" possono interagire con la superficie delle cellule o con recettori nucleari. Cellule o tessuti con alta attività proliferativa sono ad alto rischio apoptotico e risultano molto sensibili all'azione di agenti che inducono apoptosi. In questo contesto, cellule danneggiate durante le varie fasi del ciclo cellulare e che dimostrano una non idonea progressione nei diversi "checkpoint" fino a raggiungere la fase G2/M sono candidate all'apoptosi.

Chiaramente, la morte cellulare programmata è un processo attivo che richiede energia metabolica; ciò rappresenta una distinzione importante fra l'apoptosi e la morte cellulare per necrosi. Quest'ultima riflette la disintegrazione di una cellula che ha perso l'integrità metabolica. Nell'apoptosi le riserve di energia sono importanti per sintetizzare le molecole necessarie per il meccanismo apoptotico.

Fino all'ultimo decennio era possibile valutare la

Segnali di morte e sopravvivenza cellulare

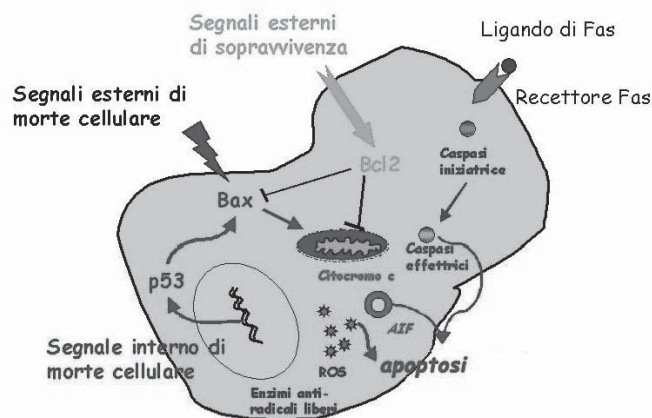


Figura 1

Regolazione del processo apoptotico attraverso il "signalling" cellulare. L'attivazione del recettore di Fas attiva un segnale di traduzione che induce una proteina effettrice delle caspasi. Mitogeni e fattori di crescita possono inibire i segnali di morte cellulare, favorendo la prevalenza di fattori protettivi. Alterazioni nello stato ossidativo contribuiscono a variazioni dell'attività dei mitocondri favorendo l'innesco della cascata apoptotica.

AIF, "apoptosis-inducing factor"; ROS, specie reattive dell'ossigeno.

morte cellulare programmata utilizzando cellule in coltura e impiegando citofluorimetria o procedendo all'estrazione del DNA e alla separazione dei frammenti su gel di agarosio. Più recentemente le tecniche utilizzate consentono anche la valutazione in situ dei frammenti di DNA con tecniche non isotopiche.

D'altra parte il progredire delle conoscenze, e la possibilità di impiegare cellule da sangue periferico, ha permesso di caratterizzare i meccanismi di deplezione cellulare considerando l'accumulo o la riduzione delle concentrazioni di molecole, che si possono indicare come biomarcatori specifici dei meccanismi di morte cellulare programmata. In futuro sarà possibile che la loro determinazione venga utilizzata per la valutazione dello stato di malattia o per il monitoraggio terapeutico.

A partire dagli anni '90 l'attenzione posta al fenomeno dell'apoptosi ha subito un notevole impulso grazie alla dimostrazione che linfociti di soggetti infettati dal virus HIV esibiscono una aumentata apoptosi in vitro.

INFEZIONE DA HIV

Una delle condizioni patologiche più evidenti dei meccanismi di morte cellulare sembra legata alla condizione della infezione da HIV.

I principali meccanismi attraverso i quali si instaura l'immunodeficienza finiscono per decretare una drastica riduzione della popolazione linfocitaria. La progressiva riduzione di CD4 si sviluppa nei tempi successivi all'infezione e dopo il periodo di sieroconversione, anche in fase asintomatica, per culminare in una netta riduzione nella fase di malattia (Figura 2) (1).

Le osservazioni più rilevanti evidenziano la attivazione di meccanismi che si caratterizzano come quelli legati all'apoptosi, anche se evidenze più recenti propongono processi differenti (2).

Per spiegare l'aumentata apoptosi delle cellule T sono stati proposti diversi meccanismi che sembrano essere fra loro collegati. Secondo le ipotesi più accreditate, l'interazione delle proteine del virus con molecole di membrana finisce per favorire la trimerizzazione del recettore Fas con la conseguente attivazione delle caspasi che scindono il DNA. Altri meccanismi valutano la possibilità che le proteine virali riducano l'azione di Bcl2 favorendo il rilascio di citocromo c e l'apoptosi (3). Altri autori considerano invece che la causa principale della deplezione linfocitaria sia soprattutto determinata dalla incapacità del sistema emopoietico di rispondere a una maggiore distruzione di CD4. Non si tratta quindi di esaurimento, ma di un deficit nella ripopolazione cellulare. Il sistema immunitario non sarebbe in grado di generare un numero di cellule sufficienti per ripopolare le cellule uccise dal virus o mediante altri meccanismi immunologici.

Dato che la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è un'infezione virale che colpisce il sistema immunitario, è ovvio che i marcatori di progressione debbano essere virologici e/o immunologici; alcuni di essi sono stati largamente impiegati, e in parte lo sono tuttora, per documentare il decorso della infezione da HIV.

Da quanto abbiamo detto, è chiaro che la maggior parte di essi non risponde ai requisiti enunciati per scarsa sensibilità e riproducibilità (antigenemia e viremia), tardiva comparsa (neopterina, β -2-microglobulina, TNF, interferon- α acido labile), incostanza di rilievo, mancanza di metodi standardizzati, non sufficiente validazione clinica (tutti gli altri). Ne consegue che attualmente gli unici marcatori che rispondono a tutti i requisiti richiesti sono le determinazioni del numero dei linfociti CD4+ e delle copie di RNA virale nel plasma. In particolare, il numero dei linfociti CD4+ costituisce finora il più sicuro marcatore per documentare lo stato della malattia, mentre il numero di copie di RNA virale nel plasma (detto anche, seppure impropriamente, carica virale) rappresenta l'indicatore più fedele dell'entità della replicazione virale. Gli altri parametri, come i marcatori di attivazione immunologica, la produzione delle varie citochine, il rapporto tra linfociti "naïve" e della memoria o il fenotipo virale, offrono l'opportunità di studiare alcuni aspetti patogenetici dell'infezione, ma non sono per il momento utilizzabili a fini pratici.

Secondo le attuali conoscenze, che valgono per la maggioranza dei pazienti, anche se non per tutti, una caduta del numero dei linfociti CD4+ sta già ad indicare una rottura dell'equilibrio tra replicazione virale e capacità di ripopolazione da parte dell'organismo e può essere considerato pertanto un indice di progressione tardivo, ancorché entro certi limiti reversibile. Ne consegue pertanto che, almeno in teoria, i valori della replicazione virale possono rappresentare il marcatore ideale che soddisfa tutte le esigenze già ricordate: sensibilità, precocità, significato patogenetico, facilità e riproducibilità di esecuzione. Vedremo ora su quali basi poggiano queste affermazioni, cercando inoltre di dimostrare come dalla replicazione virale dipendano direttamente anche alcune delle modificazioni immunologiche coinvolte nella patogenesi della malattia.

Come già detto, in risposta allo stimolo fitogenico, le cellule poste in coltura possono rispondere diversamente in rapporto alla condizione determinatasi da stimoli percepiti quando i linfociti T permangono nelle differenti "stazioni" del sistema linfoide prima che vengano riversati nel sangue. Una possibilità per caratterizzare queste differenze è offerta dallo studio di marcatori del

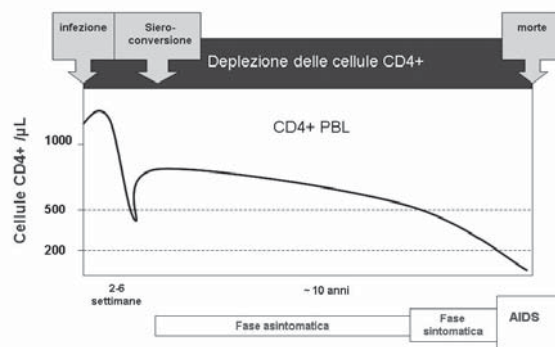


Figura 2
Andamento dei linfociti CD4 nel corso dell'infezione da HIV.

ciclo cellulare. L'attività dei vari complessi ciclina/cdk che regolano la progressione attraverso le fasi G1-S-G2 del ciclo cellulare è controllata attraverso la sintesi di appropriate cicline, che accompagna le specifiche fasi del ciclo cellulare. Linfociti isolati da sangue periferico di soggetti HIV+ mostrano alti livelli di ciclina B. Questi livelli di espressione sono evidenti in popolazioni linfocitarie indipendentemente dall'espressione di biomarcatori di superficie, quali CD4 e CD8 (4).

E' interessante che tra le due e le quattro settimane dopo l'avvio della terapia antiretrovirale i livelli di espressione di ciclina B diminuiscano quasi fino a livello dei controlli. Questa diminuzione è preceduta dalla caduta dei livelli di HIV-RNA e da un aumento dei livelli di CD4. Inoltre nelle stesse condizioni l'attività della cdc2 chinasi risulta costantemente aumentata prima, durante e dopo la fase S del ciclo. Nei linfociti di soggetti controllo invece i livelli di ciclina B aumentano progressivamente in modo parallelo alla transizione in ciclo e la massima espressione coincide con la transizione dalla fase G2 alla fase M (5).

L'ulteriore caratterizzazione di tale fenomeno evidenzia un palese accumulo di prodotti non degradati, probabilmente per inattivazione del proteasoma; tra le proteine citoplasmatiche normalmente associate al ciclo cellulare si osserva l'aumento delle chinasi p16 e p21, del fattore RB, della p53, della stessa nucleolina (6, 7). L'incremento di tali proteine è fino a 250 volte il loro valore riscontrato nei controlli ed esse si presentano con un buon grado di ubiquitinazione, il che le fa considerare come proteine destinate allo smaltimento, non più in grado di svolgere le loro attività e pertanto substrati del complesso multiproteasico noto come proteasoma. La particolarità del risultato è anche dovuta al fatto che esso si presenta in maniera costante nella popolazione campione analizzata indipendentemente dalla storia naturale dell'infezione, dal numero dei CD4+ e dal valore della carica virale.

EFFETTI DELLO STRESS OSSIDATIVO E INVECCHIAMENTO

I meccanismi alla base dei processi di attivazione e proliferazione cellulare dei linfociti T richiedono energia. Le cellule modificano il loro metabolismo per raggiungere uno stato completo di attivazione, provvedendo al riarrangiamento del citoscheletro, alla sintesi di proteine e di trasportatori, scambio lipidico, con una serie di processi riparativi e di protezione (8, 9). Il meccanismo energetico principale è quello della fosforilazione ossidativa, tuttavia in determinate condizioni le cellule possono utilizzare glucosio (10). In differenti stati patologici quali il cancro, cellule T infiltranti possono utilizzare una bassa quantità di ossigeno, trovandosi in condizioni di ipossia (11). I normali livelli di ossigeno nel sangue periferico variano dal 5% allo 0,5% nei microvasi (12).

I modelli di linfociti T in coltura, comunemente impiegati in vitro, si trovano quindi in ambiente iperossico (20%) e in tali condizioni vanno facilmente incontro alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (13); è

quindi possibile che "signalling", metabolismo e funzioni delle cellule T vengano influenzate dalle variazioni registrate in coltura.

Numerose evidenze sperimentali sottolineano che la produzione di ROS e lo stress ossidativo siano una delle principali cause dell'invecchiamento cellulare (14). L'invecchiamento è associato con una progressiva inadeguatezza della risposta immunitaria caratterizzata da una insufficienza della risposta cellulare ai vaccini e un accumulo di cellule CD8 che sembrano in uno stato di senescenza replicativa (15, 16). Numerose ipotesi sono state formulate per caratterizzare questa condizione di stimolo proliferativo cronico e condizioni di stress ossidativo (17, 18).

Sebbene l'immunosenescenza influenzi molti aspetti della immunità innata e acquisita, i difetti nella immunità delle cellule T sono più evidenti e meglio documentati (19). E' evidente, sia nell'uomo anziano che in modelli animali, che il rinnovo della popolazione delle cellule T ed il loro numero spesso è correlato ad una migliore risposta alla stimolazione di antigeni e patogeni. Nell'anziano fattori dipendenti dalla ridotta funzione del timo e dal continuo stimolo proliferativo, subito dalle cellule T, provocano una riduzione delle cellule liberate nella circolazione dal compartimento "naïve" ed un aumento delle cellule T, che sono state stimulate dal contatto anche con agenti patogeni. Questo mantiene le cellule del compartimento "naïve" in uno stato di proliferazione omeostatica, che sfocia in una diminuzione del compartimento delle cellule "naïve" ed un aumento delle cellule "memory". Una condizione che può essere agevolmente caratterizzata da esperimenti in vitro usando agonisti delle cellule T in assenza di cellule APC (Figura 3).

Durante l'invecchiamento la produzione di TNF- α è incrementata e numerose evidenze sperimentali dimostrano una maggiore suscettibilità dei linfociti all'apoptosi indotta da TNF- α (20-23). Inoltre il meccanismo dell'a-

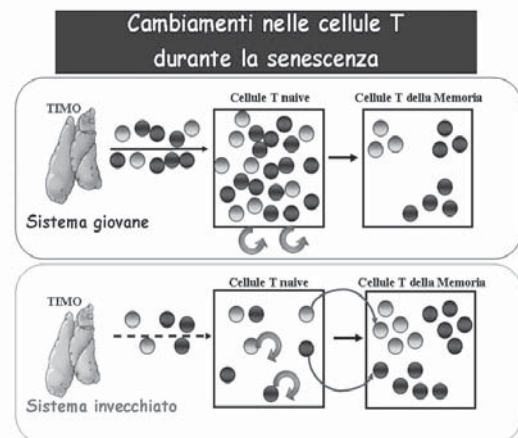


Figura 3

Variazioni nella popolazione di cellule T nella senescenza. Una diminuita attività del timo contribuisce ad una ridotta produzione del pool delle cellule "naïve". Le cellule T vanno incontro ad una proliferazione omeostatica con il mantenimento del pool delle cellule "memory".

poptosi in linfociti di soggetti anziani sembra associato ad un aumento delle caspasi-8 e caspasi-3.

Studi più recenti evidenziano la possibilità che la risposta cellulare possa essere condizionata dal meccanismo di attivazione di alcuni fattori di trascrizione quali NF- κ B. Studi sull'invecchiamento dimostrano ad esempio una riduzione dell'attivazione di NF- κ B in linfociti di soggetti anziani stimolati con fitoemagglutina rispetto ai linfociti di soggetti giovani (24). Più recentemente è stato dimostrato che la quota di NF- κ B che si lega al DNA nei linfociti invecchiati è significativamente inferiore (25).

NF- κ B è uno dei fattori di trascrizione particolarmente coinvolto nella attivazione dei geni della risposta immunitaria. Il complesso NF- κ B esiste sia come eterodimero o omodimero della famiglia di proteine Rel. La forma prevalente è costituita da eterodimeri che comprendono le subunità p50 e p65 e differenti subunità inibitorie (I κ B). Nelle cellule non stimolate, NF- κ B viene mantenuto nel citoplasma; quando le cellule vengono esposte a induttori di NF- κ B, come TNF- α o altre citochine, la subunità I κ B viene fosforilata e successivamente degradata attraverso l'attività del proteasoma; le subunità p50 e p65 sono quindi libere di migrare nel nucleo dove si legano ad appositi siti di trascrizione (26, 27).

Recentemente è stato dimostrato che l'attivazione di NF- κ B è in grado di inibire l'apoptosi, in particolare quella indotta tramite TNF- α (28, 29). La soppressione dell'apoptosi da parte di NF- κ B dipende dalla induzione di un certo numero di geni (IAP1 e IAP2). L'attivazione dei recettori TRAF1 e TRAF2 è in grado di inibire l'espressione e l'attivazione della cascata delle caspasi. Altri autori hanno anche dimostrato come l'attivazione di NF- κ B a livelli utili ad inibire l'apoptosi è associata alla aumentata espressione di proteine Bcl-2 (30, 31).

Sebbene all'inizio NF- κ B sia stato caratterizzato come regolatore del processo di differenziazione delle cellule B e quindi associato ai diversi meccanismi dell'infiammazione e della risposta immune, esperimenti con topi "knockout" deficienti delle proteine Rel sono risultati letali a livello embrionale a causa di una massiccia morte apoptotica delle cellule epatiche (32). Queste evidenze suggeriscono che NF- κ B è uno dei più importanti fattori di regolazione della morte apoptotica, così come della sopravvivenza, probabilmente in funzione del tipo cellulare e/o dei differenti stimoli. D'altra parte, il blocco della attivazione di NF- κ B, tramite modificazione dell'espressione di I κ B o RNAi o trattamento farmacologico, rende molte cellule sensibili all'apoptosi in risposta a stimoli diversi. Le cellule cancerogene, in particolare, sembrano perdere la loro chemioresistenza quando un'elevata attività NF- κ B viene ridotta. Tuttavia, in altri modelli sperimentali, NF- κ B si è dimostrato efficace nello svolgere un ruolo pro-apoptotico. In cellule nelle quali veniva silenziata l'espressione delle chinasi responsabili della fosforilazione di I κ B, era possibile distinguere la differenza tra morte per apoptosi e morte per necrosi. Infatti, mentre le cellule NF- κ B-deficienti erano più sensibili all'apoptosi, l'inibizione chimica delle caspasi incrementava la quantità di cellule che moriva per necrosi (33). Un'attivazione

cronica di NF- κ B viene chiaramente associata alla senescenza cellulare o all'invecchiamento (34).

Pertanto NF- κ B sembra essere coinvolto in un complesso di meccanismi che regolano il destino della cellula e che spesso ricadono in uno dei diversi eventi di morte cellulare. Geni noti come importanti regolatori di questi processi sono stati identificati come target di NF- κ B; sono compresi tra questi i geni che codificano per Bcl-2 ed altri fattori anti-apoptotici, quelli che regolano l'espressione di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi ed infine quelli che regolano l'espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare, quali p21 e la ciclina D. Sulla base delle evidenze più recenti sembra che il ruolo di NF- κ B possa venire determinato in parte dallo stato di attivazione di altre cascate di segnale, quali il "pathway" della chinasi N-terminale di c-jun (JNK) o il sistema nel quale è coinvolto p53 (35, 36).

La ridotta attivazione di NF- κ B in condizioni di stress ossidativo e nell'invecchiamento potrebbe essere imputata ad una ridotta attività proteolitica del proteasoma (37). Lo stress ossidativo è stato spesso coinvolto nella perdita di attività funzionali che si accompagna all'invecchiamento; in maniera più specifica è stato sempre segnalato il coinvolgimento dei gruppi tiolici nella risposta a stimoli esterni (38, 39). Tuttavia, non esistono chiare evidenze sugli effetti dello stress ossidativo sull'attività del proteasoma nei linfociti T ex vivo.

La teoria dei radicali liberi ammette come postulato che il declino diffuso e progressivo delle capacità cellulari durante l'invecchiamento è una conseguenza del danno ossidativo causato dai ROS. Pertanto il proteasoma da organello responsabile della rimozione di proteine modificate ossidativamente può esso stesso divenire un bersaglio diretto dell'attività ossidante durante l'invecchiamento. In questo ambito è rilevante osservare che linfociti T di donatori in giovane età, trattati con sostanze pro-ossidanti, mimano il comportamento dei linfociti di soggetti anziani. Gli effetti includono una diminuzione del glutatione, un aumento dei gruppi carbonilici delle proteine, un aumento della produzione dei ROS ed una riduzione dell'attività del proteasoma (40).

D'altra parte numerose osservazioni evidenziano un ruolo chiave per il proteasoma nella regolazione del ciclo cellulare modulando la progressione nelle fasi da Go a S (41). Inoltre, numerosi fattori del "signalling" cellulare, dalla variazione del Ca²⁺ alla deplezione del glutatione ridotto o alla modificazione delle chinasi, possono contribuire a ridurre la proliferazione cellulare (25, 42, 43).

I risultati fin qui commentati sottolineano chiaramente il ruolo centrale dello stress ossidativo nella diminuita attività del proteasoma durante l'invecchiamento, che può contribuire ad una riduzione della risposta cellulare. Tali evidenze non solo sono in accordo con i risultati ottenuti su differenti sistemi cellulari, suggerendo che le alterazioni nello stato "redox" dei linfociti T controllano la loro risposta a stimoli differenti (44, 45), ma forniscono inoltre una spiegazione funzionale all'evidenza di una ridotta risposta cellulare nella senescenza, dovuta ad una insufficiente attivazione di NF- κ B. Queste osservazioni pos-

sono fornire utili informazioni sui meccanismi della risposta cellulo-mediata con ricadute nelle strategie di immunomodulazione e nelle osservazioni legate alla immunosenescenza.

BIBLIOGRAFIA

- Gougeon ML, Montagnier L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1999;887:199-212.
- Kelleher AD, Zaunders JJ. Decimated or missing in action: CD4+ T cells as targets and effectors in the pathogenesis of primary HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2006;3:5-12.
- Cloyd MW, Chen JJ, Adegbuyega P, et al. How does HIV cause depletion of CD4 lymphocytes? A mechanism involving virus signaling through its cellular receptors. *Curr Mol Med* 2001;1:545-50.
- Piedimonte G, Corsi D, Paiardini M, et al. Unscheduled cyclin B expression and p34 cdc2 activation in T lymphocytes from HIV-infected patients. *AIDS* 1999;13:1159-64.
- Cannavo' G, Paiardini M, Galati D, et al. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. *Blood* 2001;97:1756-64.
- Galati D, Paiardini M, Cervasi B, et al. Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2003;188:1483-91.
- Paiardini M, Cervasi B, Galati D, et al. Early correction of cell cycle perturbations predicts the immunological response to therapy in HIV-infected patients. *AIDS* 2004;18:393-402.
- Van Laethem F, Leo O. Membrane lipid rafts: new targets for immunoregulation. *Curr Mol Med* 2002;2:557-70.
- Beretta L. Translational control in T lymphocytes. *Int Rev Immunol* 2004;23:347-63.
- Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, et al. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 2005;20:1327-38.
- Welsh SJ, Koh MY, Powis G. The hypoxic inducible stress response as a target for cancer drug discovery. *Semin Oncol* 2006;33:486-97.
- Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 2005;5:712-21.
- Larbi A, Kempf J, Pawelec G. Oxidative stress modulation and T cell activation. *Exp Gerontol* 2007;42:852-8.
- Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci* 2006;1067:10-21.
- Pawelec G, Rehbein A, Haehnel K, et al. Human T-cell clones in long-term culture as a model of immunosenescence. *Immunol Rev* 1997;160:31-42.
- Effros RB. Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. *Vaccine* 2007;25:599-604.
- von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:99-110.
- Toussaint O, Dumont P, Remacle J, et al. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *ScientificWorld J* 2002;2:230-47.
- Nikolich-Zugich J. T cell aging: naive but not young. *J Exp Med* 2005;201:837-40.
- Fagiola U, Cossarizza A, Scala E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993;23:2375-8.
- Gupta S. A road to ruines: An insight into immunosenescence. *Adv Cell Aging Gerontol* 2003;13:169-85.
- Gupta S. A role of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in increased lymphocyte apoptosis in aged humans. *Mech Ageing Dev* 2004;125:99-101.
- Gupta S, Chiplunkar S, Kim C, et al. Effect of age on molecular signaling of TNF- α -induced apoptosis in human lymphocytes. *Mech Ageing Dev* 2003;124:503-9.
- Trebilcock GU, Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated human T lymphocytes during aging. *Gerontology* 1996;42:137-46.
- Gupta S, Bi R, Kim C, et al. Role of NF-kappaB signaling pathway in increased tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. *Cell Death Differ* 2005;12:177-83.
- Brown K, Gerstberger S, Carlson L, et al. Control of I κ B-alpha proteolysis by site-specific, signal induced phosphorylation. *Science* 1995;281:1360-3.
- Delahase M, Hayakawa M, Chen Y, et al. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999;284:309-13.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, et al. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2514-26.
- Senftleben U, Li ZW, Baud V, et al. IKK-beta is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Cell* 2001;14:217-30.
- Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, et al. Tumor necrosis factor-induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF- κ B activation in primary hippocampus neurons. *J Biol Chem* 1999;274:8531-8.
- Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptotic inhibitor Bclx (L). *Mol Cell Biol* 2000;20:2687-95.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995;376:167-70.
- May MJ, Madge LA. Caspase inhibition sensitizes inhibitor of NF-kappa B kinase beta-deficient fibroblasts to caspase-independent cell death via the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2007;282:16105-16.
- Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, et al. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 2007;21:3244-57.
- Gurova KV, Hill JE, Guo C, et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappa B-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17448-53.
- Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, et al. Role of NF-kappa B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000;404:892-7.
- Ponnappan U. Ubiquitin-proteasome pathway is compromised in CD45RO+ and CD45RA+ T lymphocyte subsets during aging. *Exp Gerontol* 2002;37:359-67.
- Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol* 2003;33:2178-85.
- Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 2002;38:713-21.

40. Das R, Ponnappan S, Ponnappan U. Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic Biol Med* 2007;42:541-51.
41. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 2002;82:965-80.
42. Williams MS, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1144-51.
43. Hadzic T, Li L, Cheng N, et al. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol* 2005;175:7965-72.
44. Kavanagh TJ, Grossmann A, Jaecks EP, et al. Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content. *J Cell Physiol* 1990;145:472-80.
45. Kanner SB, Kavanagh TJ, Grossmann A, et al. Sulfhydryl oxidation down-regulates T-cell signaling and inhibits tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:300-4.