

CORSO DI IMMUNOLOGIA

- APPUNTI -

Prof. Andrea Cossarizza

a cura di:

Marcello Pinti - Laura Moretti - Milena Nasi - Giada Zecchi - Annalisa Imovilli

INTRODUZIONE

OVVERO “ISTRUZIONI PER L’USO DEGLI APPUNTI”

Esistono oggi molti ottimi testi di Immunologia, estremamente aggiornati e di grande spessore scientifico e culturale, e di certo l’ultima delle mie intenzioni è di mettermi a farne uno. La mia passata esperienza di studente mi ha insegnato che, specialmente nel nostro settore, il libro di testo, se ben fatto come quelli da me consigliati, è qualcosa di assolutamente unico, insostituibile, e che gli appunti di lezione, per quanto ben presi e trascritti, non riescono mai a competere con esso, neanche lontanamente. Trovo che però possa essere utile a chi si accinge ad affrontare una disciplina non proprio semplice avere una traccia da seguire, una specie di fil rouge che segua l’impostazione logica data alla materia dal docente. Tale traccia deve però essere semplicemente considerata la base da cui partire per approfondire e completare lo studio dell’Immunologia con uno dei libri di testo.

E’ appunto con questo spirito che è nata l’idea di mettere insieme gli appunti e gli schemi delle lezioni che ho tenuto recentemente (ottobre-dicembre 1998, marzo-maggio 1999, ottobre 99 - gennaio 2000) nell’ambito dell’insegnamento di Immunologia, secondo anno del Corso di Laurea in Biotecnologie, e terzo anno del Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia, e di metterli in rete a disposizione di tutti gli studenti che sono “tecnologicamente avanzati”. Tale proposta è stata accolta con grande entusiasmo dai miei giovani collaboratori, i Dott. Marcello Pinti, Laura Moretti e Milena Nasi (poveretti: già non mi sentono parlare abbastanza in laboratorio, si sono pure beccati il sottoscritto in aula...), e pure da volonterose e computerizzate studentesse, Giada Zecchi e Annalisa Imovilli (CdL Medicina e Chirurgia) che hanno pazientemente e diligentemente trascritto un sacco di appunti. A tutti loro va da un lato la (quasi) totale responsabilità di quanto starete per leggere (Ponzio Pilato *docet*, ma in verità un’occhiatina gliel’ho data), dall’altro il mio più vivo ringraziamento per l’opera svolta, una vera impresa (ma speriamo che il finale sia un po’ migliore, cioè che più di qualcuno - di voi - stia a galla meglio di Jack...). In ogni caso, questo è il primo tentativo del genere che viene fatto, e se non altro noi ci siamo divertiti un sacco. Il risultato è senz’altro largamente migliorabile. I vostri suggerimenti e le vostre critiche saranno quindi non soltanto graditi, ma anche vivamente richiesti e casomai apprezzati.

Quindi, lungi dall’essere gli appunti su cui basare unicamente la preparazione all’esame (non lo fate, che tanto vi becco subito...), questi fogli hanno il solo compito di introdurre argomenti che vanno affrontati con il vostro amato libro di testo. E se qualche volta, per puro caso, l’argomento trattato a lezione dovesse essere più chiaro o comprensibile, si vede che il nostro sforzo è servito a qualcosa, e che forse un po’ di Immunologia la so anch’io....

Buon lavoro,

Andrea Cossarizza

Per la consultazione elettronica di questo documento (formato adobe acrobat):

- potete raggiungere l’indice da ogni pagina, “cliccando” sul numero di pagina della stessa (angolo inferiore destro);
- ogni voce dell’indice è collegata alla prima pagina della sezione relativa.

Premete qui per raggiungere la mia area web: **- AREA WEB -**

oppure qui, per inviarmi una email: **EMAIL - @ -**

INDICE

- Cenni Storici
- Cenni sulla Filogenesi del Sistema Immunitario
- Introduzione all'Immunologia
- Schemi di Anatomia
- Caratteristiche generali degli Antigeni
- Sviluppo e Maturazione dei Linfociti B
- Genetica delle Immunoglobuline
- Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità
- HLA-G
- Il Recettore dei Linfociti T
- Maturazione dei Linfociti T
- Le Citochine
- La Citotossicità
- Schemi di Citometria a Flusso
- L'Apoptosi: Testo
- L'Apoptosi: Schemi ed Immagini
- Introduzione all'IMMUNOPATOLOGIA
- L'Allergia: Testo
- L'Allergia: Schemi
- Il Complemento
- Ipersensibilità di tipo III

CENNI STORICI

Il termine “**IMMUNITAS**” veniva già usato ai tempi dell’antica Roma per intendere un’esonazione dal pagare alcune tasse o adempiere a obblighi; successivamente il termine è stato utilizzato dalla Chiesa con lo stesso significato.

39-65 d.C. **MARCUS ANNAEUS LUCANUS** utilizza forse per la prima volta il termine **IMMUNITAS** in senso medico nel poema epico “Pharsalia” riferendosi alla resistenza verso il morso di serpenti dimostrata da alcuni individui in qualche tribù del Nord Africa.

Nel Medio Evo il **COLLE** (“*Equibus Dei gratia ego immunis evasi*”) utilizza il termine **IMMUNITAS** in riferimento ad una caratteristica fisiologica dell’uomo, ovvero alla possibilità di non ammalarsi durante una epidemia di peste.

430 a.C. **TUCIDIDE** pone di fatto i primi concetti immunologici osservando, durante l’epidemia di peste ad Atene, che un individuo non può essere colpito due volte dalla malattia.

541 d.C. **PROCOPIO** osserva che chi si era ammalato di peste poteva assistere caritatevolmente coloro che erano malati, senza il rischio di ammalarsi una seconda volta.

1540 **FRACASTORO** pone il problema della possibilità di immunizzare se stessi contro la febbre pestilenziale.

Durante tutto il Medio Evo si trova l’utilizzo consueto del *mitridaticum*, un medicamento particolare, ovvero un agente tossico che preso in piccole dosi proteggeva l’organismo. Tale usanza deriva il nome dal re del Ponto (**MITRIDATE VI**): ossessionato dalla paura di essere avvelenato dai suoi nemici, per difendersi era solito prendere, giornalmente, un po’ di veleno.

Fin dal *2000 a.C.* si riteneva inoltre che la **MALATTIA** avesse un’origine **MAGICA** o **DIVINA**: gli individui che non si ammalavano (ovvero quelli nei quali **l’immunità naturale** era particolarmente efficiente) erano considerati uomini pii o santi in quanto non avevano alcuna colpa da espiare, mentre coloro che si ammalavano e con successo guarivano (**immunità acquisita** particolarmente efficiente) erano peccatori in grado di redimersi. I peccatori gravi, invece, non avendo possibilità di redenzione, morivano travolti da atroci sofferenze. Queste convinzioni sono state di fatto condivise fino a poco più di un secolo fa.

1660 data di fondazione della **Royal Society** a Londra, società nata con l’intento di divulgare le nozioni scientifiche.

1714 **EMANUELE TIMONI** e **JACOB PYLARINI** pubblicano una lettera indirizzata alla Royal Society in cui riportano l’osservazione di quello che accadeva a Costantinopoli (oggi Istanbul) da più di 40 anni, ovvero la pratica della “variolazione”. Con tale pratica si era soliti inserire sottocute del materiale biologico proveniente da croste prelevate dai casi favorevoli di vaiolo. Gli individui si ammalavano lievemente e non prendevano in seguito il vaiolo. In realtà questa usanza derivava da una molto più antica praticata in Cina, secondo la quale il vaiolo poteva essere prevenuto facendo inalare (narice di destra per gli uomini e di sinistra per le femmine!) le croste essiccate prelevate da coloro che erano guariti. Tale pratica di variolazione, grazie all’opera di **Lady Mary Wortley Montagu** (moglie dell’ambasciatore inglese a Costantinopoli, e futuro fondatore del British Museum) che cercò di diffonderla vaccinando anche i propri figli, venne accettata dai londinesi, soprattutto dalla aristocrazia, all’interno della quale divenne perfino una moda da seguire.

1721-1722 **Royal Experiment**: si può definire come il primo vero trial clinico, organizzato per volere della corona, che ha dimostrato in primo luogo la non tossicità, quindi l’efficacia della variolazione. Alcuni condannati a morte furono variolizzati e tenuti sotto osservazione per un certo periodo. Cinque su 6 svilupparono una lieve infezione, guarita spontaneamente in breve tempo. Il sesto, che aveva già avuto il vaiolo, non si ammalò per nulla. Quindi qualche condannato fu mandato in luoghi dove era in corso un’epidemia di vaiolo, ed obbligato ad assistere ed accudire persone malate (dormendo nello stesso letto di bimbi ammalati). Questo non si ammalò, dimostrando così l’efficacia della pratica preventiva. Re Giorgio I quindi fece variolizzare (con successo) i propri figli.

1798: il grosso pregio di **JENNER** (considerato il padre dell'immunologia) fu quindi quello di riesumare i vecchi insegnamenti e le osservazioni del passato raccolti dalla Royal Society, riportando alla luce l'usanza, che ormai alla fine del 1700 era passata di moda, di variolare gli individui. Egli modificò in realtà tale pratica preparando un "vaccino" allestito dalle pustole vaiolose delle vacche, avendo osservato che gli allevatori che si ammalavano di una forma lieve, presa appunto dalle vacche, venivano risparmiati dalla forma di vaiolo umano, molto più pericoloso (mortalità anche del 20%).

FILOGENESI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

LEZIONE DEL PROF. EDWIN L. COOPER

a cura di **Giada Zecchi**

L'immunologia è una disciplina scientifica piuttosto recente - il suo periodo di grande sviluppo inizia infatti intorno agli anni '60; i primi approcci, però, risalgono già intorno all'anno 1000 A.C., ad opera dei Cinesi, i quali furono i primi ad praticare una forma di vaccinazione contro il vaiolo (vedi lezione sui cenni storici). Alla fine del 1700, Jenner scoprì che donne che quotidianamente mungevano il latte bovino, risultavano immunizzate (ovvero "protette") contro il vaiolo. La deduzione di Jenner fu che doveva esserci una relazione tra il virus del vaiolo bovino e quello che causava la malattia nell'uomo, e che l'infezione con il primo conferiva immunità al secondo.

Nel secolo successivo, il campo dell'immunologia era dominato da Francesi e Tedeschi, che enfatizzarono certi aspetti del sistema immunitario, in particolare *anticorpi e tossine*, definiti come "meccanismi" di protezione, ovvero insieme di molecole che erano ritrovate nei sieri. Nulla, però, si sapeva di quelle che erano le cellule coinvolte nella risposta immunitaria. Questo campo di opinioni monolitico, che faceva perno sulla teoria di una risposta fondamentalmente umorale, fu scisso nel XIX secolo da **METCHNIKOFF**, uno zoologo russo (ritenuto il "papà" dello joughurt), che dopo avere viaggiato per tutta l'Europa, approdò sulle coste della Sicilia, e qui, cominciò a studiare particolari specie di pesci. L'esperimento, estremamente semplice, ma determinante, di Metchnikoff, fu quello di iniettare particelle estranee in larve trasparenti, che vivevano nell'acqua. Quello che notò, fu che non appena queste particelle venivano iniettate nella larva, delle "micellule" della larva si precipitavano a formare una barriera contro le particelle estranee di granuloma, ivi iniettate. Da questo semplice esperimento, nacque l'ipotesi che delle cellule fossero responsabili del fatto che l'organismo potesse riconoscere ciò che è estraneo (NON-SELF), da ciò che non è estraneo (SELF). Anche se questa osservazione era estremamente semplice, creò una spaccatura fra i dogmi tedeschi relativi all'**immunità umorale**, ed i sostenitori di Metchnikoff, ovvero della presenza di una immunità **cellulo-mediata**.

Metchnikoff, in ogni caso, può essere definito il padre dell'immunologia comparata, poiché, mentre all'epoca, tutti gli studi erano focalizzati sui mammiferi, le sue osservazioni si basarono invece su specie animali inferiori. Egli vinse poi il premio Nobel nel 1908, insieme a Paul Ehrlich, e lasciò la Sicilia per recarsi a Parigi dove lavorò presso l'Istituto Pasteur, nel cui atrio oggi riposano le sue ceneri.

Solo molti anni dopo si cominciò ad approfondire ciò che aveva studiato Metchnikoff, e si vide che:

Dal midollo osseo si moltiplicava una linea di **cellule staminali**, che poi, si differenziavano in due possibili linee cellulari:

1. Alcune si dirigevano nel timo dove si sviluppavano cellule indirizzate contro ciò che sarebbe poi riconosciuto come non-self, mentre venivano distrutte quelle che avrebbero potuto intervenire contro cellule proprie del nostro organismo.
2. Altre invece, erano programmate per diventare **LINFOCITI B**, destinati poi a migrare in periferia, in organi quali la milza e i linfonodi.

Nulla però, si sapeva su cosa controllasse entrambe le risposte né da dove originassero i vari tipi cellulari. Un primo contributo venne verso la metà degli anni '50 dagli studi fatti su un organo linfoide che si trova nella regione della cloaca, presente negli uccelli, detto **BORSA DI FABRIZIO**. Esso venne inizialmente rimosso, per essere studiato, ma subito non si capì a cosa servisse. Erroneamente si suppose che quest'organo, connesso all'apparato digerente di questi uccelli, fosse in un certo modo assimilabile all'appendice presente nell'uomo; in realtà, solo intorno alla metà degli anni '60 si capì che la Borsa di Fabrizio, non era altro che il midollo osseo di questi animali, dove le cellule B e i progenitori delle cellule B venivano generati.

A questo punto possiamo ad esaminare la **FILOGENESI** del sistema immunitario. Lo studio è partito inizialmente dal confronto fra uccelli, invertebrati e mammiferi, nell'ambito dei quali è possibile fare un'ulteriore suddivisione tra: **MARSUPIALI**, quali i canguri, e **PLACENTARI**, quali l'ornitorinco. La prima cosa che deve essere osservata, è la morfologia diversa che il sistema immunitario può assumere in due specie diverse quali l'uomo e l'ornitorinco, pur essendo entrambi mammiferi, differenze dovute forse al fatto che l'ornitorinco vive nell'acqua, e l'uomo no.

Passiamo ora a dire che esistono due diversi sistemi di riconoscimento:

1. **PATTERN RECOGNITION RECEPTORS** presenti nelle primitive specie invertebrate, costituiti da recettori a largo spettro, che sono in grado di riconoscere carboidrati e proteine su cellule estranee. Sono recettori che devono necessariamente riconoscere grandi famiglie di molecole, presenti su altre cellule, e la loro origine è da collocarsi in particolari famiglie di animali che sono i Tunicati e i Protocordati.
2. **CLONAL RIARRANGING GENES** associati al riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B e T (vedesi lezioni sulla immunità specifica T e B).

Contrariamente a quello che si potrebbe pensare, in base cioè alla distanza filogenetica, non sono i lombrichi gli animali invertebrati più vicini a noi, per quanto riguarda il sistema immunitario, ma sono i **PROTOCORDATI**, e i **TUNICATI**. I tunicati sono animali lunghi circa 15-20 cm., di colore marrone, visibili attaccati alle pareti che costituiscono le banchise dei porti; oggi sono particolarmente studiati in un laboratorio di ricerca a Palermo (Prof. Parrinello).

Un parametro importante che ci consente di valutare il grado di evoluzione di un animale, è il **MANTENIMENTO** della **TEMPERATURA**. Esistono animali, come pesci, anfibi e rettili, detti **ECTOTERMI**, e altri, detti **POICHILOTERMI**, in quanto non riescono a regolare la temperatura corporea, sono cioè sprovvisti di una regolazione a livello del sistema nervoso centrale; è presente una sorta di apparato termoregolatore molto rudimentale, solo in alcune specie di rettile. Un classico esempio è quello di serpenti e lucertole che sono in grado di avvertire le escursioni di temperatura e passare così ad un ambiente più freddo, quando il loro diventa troppo caldo.

Pesci, rettili, anfibi, lombrichi e tunicati, possono essere considerati, dal punto di vista teorico, molto simili mentre, dal punto di vista pratico, l'informazione è ancora scarsa per poter definire come stanno le cose.

Ricordando quella che è la duplicità del nostro sistema immunitario, diviso in una componente innata, non specifica, non anticipatoria, e non clonale, e una componente specifica, anticipatoria, e clonale, possiamo affermare che la prima di queste due deriva proprio dagli invertebrati, dove verosimilmente ha raggiunto il massimo sviluppo. C'è oggi, dunque, un risorgere degli interessi per la componente innata del nostro sistema immunitario, la componente cioè osservata ed evidenziata in prima battuta dagli studi di Metchnikoff.

Per "clonal rearranging gene" si intende un gene riarrangiato in maniera clonale, in grado di moltiplicare la cellule che lo possiede (e solo quella cellula) in grandi quantità, dopo che il recettore detto appunto clonotipico è stato innescato. Riassumendo: il sistema immunitario è diviso in due componenti:

- a. Una naturale, non specifica, non anticipatoria, non clonale, cioè basata su cellule non clonalmente indirizzate contro un antigene, presente anche nei vertebrati, e derivante da quello presente negli invertebrati.
- b. Una anticipatoria, specifica e clonale, la cui origine filogenetica è a tutt'oggi dibattuta.

Infatti, perché abbiamo sviluppato la seconda componente del sistema, quella specifica, anticipatoria, e clonale, se già avevamo quella innata, aspecifica e non clonale, ereditata dagli invertebrati? La risposta non è ancora stata data.

FORMAZIONE DELLE IMMUNOGLOBULINE

Ogni immunoglobulina è costituita da una porzione variabile (V), che è coinvolta nel riconoscimento specifico dell'antigene, e una porzione costante (C), coinvolta invece, nelle attività biologiche dell'anticorpo. Ogni anticorpo è costituito da due **catene pesanti**, e da **due catene leggere**, che presentano specifici domini ai quali è legata la variabilità genetica. Alla super-famiglia delle immunoglobuline, appartengono poi, altre molecole di superficie, estremamente importanti nella mediazione tra il riconoscimento dell'antigene e la risposta anticorpale, ovvero i T-cell receptor, e gli MHC di classe I e II.

In una tabella che illustra quella che è stata l'evoluzione dei sistemi di difesa dai protozoi, all'uomo, si può vedere come i protozoi, che costituiscono lo stadio più basso dell'evoluzione, possiedono un sistema immunitario estremamente rudimentale, costituito esclusivamente da cellule, assimilabili per caratteristiche, e per funzione, ai FAGOCITI. Protostomi e deuterostomi, invece, presentano cellule granulari che assolvono a numerose funzioni:

lisozima agglutinina

fagociti fattori chemotattici

melanina fattori opsonizzanti

fattori coagulanti

Essi producono innanzitutto fattori chemotattici, favorendo così la "corsa" di queste cellule verso l'agente estraneo; l'agglutinina, che favorisce l'adesione della cellula nel distretto colonizzato; un altro prodotto molto importante è la melanina, prodotta in risposta all'antigene con cui queste cellule vengono a contatto.

E' ora importante sottolineare la differenza tra omologia e analogia. Ad esempio, l'ala di un uccello e il braccio di un uomo sono fra loro omologhi, perché hanno la stessa origine embriologica, ma non sono analoghi perché non svolgono la stessa funzione; al contrario, l'ala di un uccello, e l'ala di una farfalla, sono fra loro analoghi, perché svolgono la stessa funzione, mentre non sono omologhi, perché hanno una diversa origine embriologica. Quindi, OMOLOGIA, significa avere la stessa origine (al limite un altissimo grado di somiglianza anche a livello di sequenza del DNA), ma diversa funzione, mentre ANALOGIA, significa avere la stessa funzione, ma non la stessa origine.

SELEZIONE CLONALE

Lo svilupparsi del sistema immunitario costituisce una semplice strategia di sopravvivenza, escogitato dalle specie animali, così come la riproduzione costituisce il meccanismo con cui viene perpetuata la specie.

Il sistema immunitario non solo deve far fronte a quelli che sono i microrganismi presenti nell'ambiente, ma anche a quei fattori antigenici che derivano dall'interno del nostro organismo, quali ad esempio i tumori. Gli studi fatti fino ad oggi hanno dimostrato come negli invertebrati non siano stati osservati, se non in casi rarissimi, tumori capaci di dare metastasi, ma solo tumori benigni. Ugualmente sono stati portati avanti esperimenti di trapianto di tumori metastatizzati su lombrichi ma senza successo. Le domande che sorgono spontanee a questo punto sono due:

1. Perché l'uomo, pur avendo ereditato il sistema immunitario da questi invertebrati è vulnerabile ai tumori?
2. Perché l'uomo, pur essendosi filogenicamente evoluto, e avendo così un "super-sistema immunitario", costituito da cellule T, cellule B, cellule NK, MHC I, MHC II, sviluppa i tumori?

Una risposta, verificatasi errata, attribuiva l'impossibilità, negli invertebrati, di sviluppare tumori, perché morivano prima di poterli sviluppare. Questo è appunto errato, perché i lombrichi vivono circa 10 anni, che è un tempo sufficientemente lungo per potere sviluppare un tumore. Gli unici due tumori che è stato possibile evidenziare in animali invertebrati sono: da un lato il neuroblastoma, e dall'altro un tumore che si sviluppa nei molluschi se posti in acque inquinate.

Il Prof. Cooper iniziò i suoi studi proprio sui trapianti di tessuto epiteliale negli anellidi (ovvero i tipici vermi di terra usati dai pescatori, l'*Eisenia foetida*, ed i lombrichi). La prima cosa che fu possibile notare fu come in presenza di un antigene, riconosciuto come non-self, si osservava, a livello del tessuto trapiantato, un reclutamento di cellule molto simili fra loro, verosimilmente prodotte con meccanismo clonale, per eliminare l'antigene. Da qui nacque il concetto di possibile risposta clonale all'antigene (le diapositive mostrate dal Prof. Cooper mettono a confronto la risposta di un tessuto muscolare all'AUTOTRAPIANTO, del tutto assente, e allo XENOTRAPIANTO, dove vediamo un imponente infiltrato di cellule "infiammatorie" e quindi la distruzione del tessuto trapiantato). E' possibile quindi vedere che nell'autotrapianto tutte le fibre muscolari rimangono integre, i leucociti non mostrano comportamenti alterati, mentre nello xenotrapianto si possono osservare leucociti più grandi, con una evidente formazione di fagosomi, che stanno ad indicare la completa distruzione delle fibre muscolari. E' stata questa una delle prime dimostrazioni dell'esistenza di meccanismi di riconoscimento del self e non-self in cellule di invertebrato (Cooper E.L., Specific tissue graft rejection in earthworms. Science 166: 1414-5, 1969).

Un altro esempio sperimentale di quello che accade nelle cellule interne al trapianto utilizzando tecniche di colture cellulari: è possibile infatti valutare la quantità di timidina radioattiva incorporata dalle cellule; l'incorporazione di timidina radioattiva rappresenta un indice di sintesi del DNA, ovvero, più DNA viene sintetizzato in presenza di timidina radioattiva, più la cellula stessa diventa radioattiva. Le cellule disposte intorno al trapianto incorporano molta timidina, soprattutto quando il trapianto è xenogenico. Quando invece, il trapianto è autogenico, o si è di fronte alla riparazione di una ferita, l'incorporazione di timidina è molto bassa, ciò vuol dire che le cellule non si stanno replicando. Si può dunque affermare che c'è una grande proliferazione cellulare solamente quando il trapianto proviene da individui di un'altra specie.

Sono due i tipi di cellule coinvolti nella risposta:

1. SMALL CELLS

2. LARGE CELLS

Solo le small cells (cellule piccole) possono incorporare timidina, mentre le large cells non sono in grado di farlo.

I linfociti T i mammiferi presentano recettori capaci di legare la lectina concanavalina-A (Con-A); anche le cellule piccole della *E. foetida* legano la Con-A, fenomeno tipico dei linfociti T, ed il legame può facilmente essere evidenziato tramite una molecola fluorescente legata appunto alla Con-A.

Come già abbiamo sottolineato, la scoperta delle large e delle small cells, è stata fatta in primo luogo tramite tecniche convenzionali di microscopia ottica ed elettronica, quindi confermata attraverso la citometria a flusso. Nei grafici ottenuti con questa tecnica, ogni puntino rappresenta una cellula, identificata in base alle proprie dimensioni, e alla propria densità, cioè la sua granularità: più le cellule sono grandi, più sono dense, più le cellule sono piccole, meno sono dense.

Per capire quali fossero le funzioni di queste small e large cells, si sono studiate le loro caratteristiche fenotipiche e differenziali utilizzando una ampia batteria di anticorpi monoclonali, e anche qui è stato identificato il gene Thy-1, che già avevamo identificato come precursore di tutto il sistema immunitario. La stessa cosa vale per la b2-microglobulina, connessa alle catene leggere dell'MHC di classe I, la cui scoperta è stata fatta su anticorpi monoclonali.

Riassumendo, abbiamo detto che le small cells montano sulla plasmamembrana il recettore per la concanavalina A, sono le più attive nella prima fase del rigetto dei trapianti enogenici, e sono positive per alcuni marcatori fenotipici; le large cells, invece, sono le più grosse, e sono negative per questi markers.

Vediamo ora come si comportano queste cellule in coltura. Si è allestita, a questo scopo, una coltura con cellule tumorali umane della linea **K562**, che contengono cromo radioattivo, il quale viene rilasciato nel momento in cui la cellula viene uccisa, liberando così una certa quantità di radiazioni. Con un contatore gamma, si contano le radiazioni liberate, e si può così risalire alla percentuale di cellule uccise. Le large cell non prendono nessun contatto con la cellula tumorale, al contrario le small cell prendono contatto intimo con queste cellule tumorali, si attivano, e modificano la loro conformazione emettendo una serie di tentacoli che attaccano la cellula tumorale e la uccidono. In realtà una sola cellula può prendere contatti con una decina di bersagli, e per questo è stata scherzosamente definita **RAMBOCITA**.

Comparando, dunque, questo sistema di large e di small cell, presente nei vermi, con quello presente nell'uomo, sicuramente il primo risulta essere più efficiente. Quindi, nonostante l'uomo sia dotato di una risposta veicolata dai linfociti T, dietro cui stanno raffinati meccanismi di riarrangiamento genico, e quindi meccanismi estremamente più complessi rispetto a quelli presenti negli anellidi, in realtà questi ultimi animali risultano essere più semplici, ma estremamente più efficienti.

Un'altra linea di cellule tumorali, utilizzati come markers per evidenziare l'efficienza del sistema immunitario dei vermi, rispetto all'uomo, è rappresentato da cellule NK-resistenti quali le **U937**, che non viene appunto uccisa dalle cellule NK (natural killer) umane, mentre viene distrutta dalle cellule (small cell) del lombrico.

A questo punto però, viene spontaneo un altro dubbio, ovvero, in seguito alla risposta del danno, doveva esserci anche un meccanismo di pulizia a questa lesione. Se le small cells sono quelle coinvolte nell'uccisione delle cellule tumorali, cosa interviene a rimuovere queste cellule uccise? La proposta fu che fossero le large cells coinvolte in questo meccanismo; questo fu evidenziato tramite microscopia elettronica. In una prima fase, la membrana delle cellule tumorali viene distrutta, a volte letteralmente squarciata; non si conosce ancora quali siano i meccanismi che inducono l'attivazione delle small cells, se una qualche molecola o altri fattori. Quindi le large cells si dispongono intorno alla cellula distrutta e la racchiudono a formare una specie di granuloma, fagocitando tutti i detriti cellulari.

ALTRE CARATTERISTICHE DELLE CELLULE DI INVERTEBRATO

Si conosce oggi una molecola chiamata AH-receptor, presente nella membrana degli invertebrati, responsabile delle reazioni di queste cellule agli agenti c.d. xenobiotici, come la diossina, o certi insetticidi. Grazie a questi recettori è possibile studiare l'effetto di certi insetticidi sulle cellule degli animali, che possono essere quindi usati come marcatori. E' quindi è stato proposto l'utilizzo degli Anellidi come sentinelle, in certe aree abitate, come indice per la valutazione dell'inquinamento dannoso per l'uomo.

In conclusione, a parte fornire un importante modello per la comprensione dello sviluppo ed il funzionamento del sistema immunitario, cosa può fare l'Anellide per aiutare l'uomo?

- si potrebbe provare a mangiare vermi e lombrichi come accade in certe parti del pianeta (ci sono buffi libri di ricette in merito, ma la nostra cultura culinaria forse non ci permette di apprezzare queste prelibatezze...);
- da alcune famiglie in America vengono utilizzati per produrre fertilizzante: vengono messi in contenitori, riempiti poi di rifiuti; nutrendosi di questi rifiuti, essi producono sostanze simili a concime, oppure ancora vengono utilizzati per la spazzatura verde (es. insalata), e per eliminare la carta.
- dal momento che i vermi rappresentano una cospicua parte della biomassa terrestre, potranno essere utilizzati nei programmi per la colonizzazione spaziale;
- molecole citotossiche da loro prodotte nelle reazioni di uccisioni di cellule tumorali umane potrebbero infine essere di interesse nella lotta ai tumori.

LEZIONE INTRODUTTIVA

L'immunologia é la scienza che studia il sistema immune, ossia l'insieme di molecole e cellule coinvolte nell'immunità. Per immunità si intende la protezione in primo luogo dalle malattie infettive e quindi dalle sostanze estranee all'organismo (il c.d. *non self*). Schematicamente, esistono 2 tipi di immunità:

- **immunità naturale (o innata)**
- **immunità acquisita (o specifica).**

L'immunità naturale è mediata da molecole e cellule preesistenti nell'organismo, non aumenta in presenza del patogeno ed è aspecifica; l'immunità acquisita è invece indotta dal patogeno e si attiva al momento della sua entrata nell'organismo.

DIFFERENZE TRA IMMUNITÀ NATURALE E IMMUNITÀ ACQUISITA

- Barriere chimico fisiche -> nel caso dell'immunità naturale sono: la pelle; la mucosa vaginale (il cui basso pH impedisce la crescita di batteri); la mucosa bronchiale (caratterizzata da muco e cellule ciliate); la mucosa nasale, la saliva, le lacrime (contenenti lisozima). Nel caso dell'immunità acquisita nelle barriere naturali dell'organismo si può avere secrezione di anticorpi, prodotti in seguito all'entrata del patogeno, da cellule del sistema immunitario associato a cute e mucose.
- Cellule -> l'immunità naturale è mediata da fagociti, ossia cellule in grado di inglobare gli elementi estranei attraverso estroflessioni di membrana; tali elementi vengono distrutti all'interno del *fagosoma* da molecole che ne mediano la lisi. L'immunità acquisita è invece mediata da *linfociti*: i linfociti B si trasformano in plasmacellule per produrre anticorpi e quindi mediano l'immunità umorale, i linfociti T sono invece responsabili dell'immunità cellulo-mediata
- Molecole coinvolte -> nell'immunità naturale intervengono molecole quali quelle costituenti ad esempio il *complemento*, un insieme una ventina di proteine che si attivano a cascata per eliminare, mediante lisi, il patogeno. Il complemento può essere attivato direttamente dal microorganismo con conseguente lisi, può attrarre il fagocita nei pressi del microorganismo, può infine opsonizzare i batteri. Nell'immunità specifica intervengono invece gli anticorpi o immunoglobuline, glicoproteine circolanti prodotte dalle plasmacellule.
- Mediatori coinvolti -> nell'immunità naturale intervengono mediatori solubili attivi su altre cellule come ad esempio le citochine prodotte dai macrofagi, tra cui l'interferone-a e l'interferone-b; nell'immunità specifica intervengono invece le citochine prodotte dai linfociti; ne sono note fino ad oggi almeno 17.

L'immunità specifica può essere di due tipi:

- **Umorale (mediata da anticorpi)**
- **Cellulo-mediata (mediata da linfociti T)**

L'immunità umorale è stata la prima ad essere studiata. Nel 1890 E. von Behring e Kitasato videro che trasferendo siero da animali che avevano superato l'infezione difterica in animali vergini, questi ultimi erano protetti dall'infezione. Nel 1900 poi Karl Landsteiner vide che anche sostanze non batteriche potevano indurre immunità umorale; nello stesso anno Paul Ehrlich formulò la cosiddetta *teoria umorale* che prevedeva la complementarità fisico chimica tra l'antigene e l'anticorpo. La *teoria cellulare* dell'immunità nacque invece nel 1893 con Metchnikoff il quale osservò che intorno ad una spina conficcata in una larva di stella marina si radunavano fagociti.

Nel 1900 Wright formulò le prime teorie sull'opsonizzazione. Nel 1942 Landsteiner dimostrò che si poteva trasferire l'immunità anche attraverso il trasferimento di cellule, il che fu confermato nel 1950 da Mackaness.

IMMUNITÀ UMORALE

I batteri extracellulari hanno antigeni che vengono riconosciuti dagli anticorpi presenti sulla superficie dei linfociti B, i quali si attivano e si differenziano in plasmacellule che a loro volta producono e secernono anticorpi; tali anticorpi si vanno poi a legare ai batteri che vengono così opsonizzati e eliminati ad opera dei fagociti. Questo tipo di immunità può essere trasferita mediante il siero.

IMMUNITÀ CELLULO MEDIATA

Interviene nel caso dei microrganismi intracellulari ed è mediata dai linfociti T : queste cellule montano un recettore che può riconoscere piccoli peptidi quando vengono loro presentati da altre cellule. Una volta avvenuto il riconoscimento, i linfociti T si attivano e possono o produrre *citochine* (linfociti T helper) o uccidere la cellula infetta (linfociti T citotossici). Questo tipo di immunità può essere trasferita mediante linfociti.

CARATTERISTICHE PRINCIPALI DELLE RISPOSTE IMMUNI

- 1) Specificità: i linfociti hanno recettori di membrana in grado di riconoscere gli epitopi di un antigene e ogni linfocita è dotato di un unico recettore che riconosce un unico epitopo. Per *epitopo o determinante antigenico* si intende ogni componente strutturale di un antigene proteico o polisaccaridico complesso che può dare origine ad una risposta immuno specifica.
- 2) Diversità: ogni linfocita è specifico per un antigene e tanti linfociti differenti costituiscono il repertorio formato teoricamente, per quanto riguarda i linfociti T, da almeno 10^{15} diverse specificità.
- 3) Memoria: Quando il sistema immunitario è già entrato in contatto col patogeno, è in grado di rispondervi con una maggiore affinità e molto più rapidamente.
- 4) Autolimitazione: quando il patogeno è stato eliminato intervengono dei meccanismi in grado di regolare e “spegnere” la risposta immunitaria.
- 5) Discriminazione del self dal non-self: il sistema immunitario è in grado di non attaccare le strutture proprie grazie al fatto che, durante lo sviluppo dei linfociti, tutte le cellule autoreattive o potenzialmente pericolose vengono eliminate; quando ciò non accade, possono insorgere le cosiddette malattie autoimmuni.

Fasi della risposta immunitaria

- 1) Fase di riconoscimento o **cognitiva**, in cui avviene il legame del recettore del linfocita con l'antigene
- 2) Fase di **attivazione** scatenata da due segnali , quello del recettore e quello del corecettore. In questa fase avviene poi la proliferazione e il differenziamento dei linfociti specifici per quel determinato antigene.
- 3) Fase **effettrice**, in cui avviene la distruzione del patogeno; in questa fase possono intervenire cellule non linfoidi e meccanismi di fagocitosi, facenti parte dell'immunità naturale.

Per spiegare la diversità dei linfociti, sono state formulate nel corso degli anni due teorie:

- 1) *Teoria dell'educazione*: Nell'organismo non esistono tanti cloni di linfociti diversi, ma quelli presenti si “adattano” al patogeno di volta in volta incontrato, diventando specifici per esso. Da vari decenni, grazie a numerose prove sperimentali, si è visto che tale teoria è del tutto infondata.
- 2) *Teoria della selezione clonale* (Jerne, 1955): quando il patogeno viene a contatto col sistema immunitario, seleziona il clone di linfociti specifico per esso e già preformato all'interno del repertorio. Vi è un numero elevato di cloni linfocitari ognuno dei quali deriva da un singolo precursore ed è in grado di legare un singolo determinante antigenico.

IL SISTEMA IMMUNITARIO COME ORGANO DI SENSO

Il sistema immunitario è un sistema cognitivo che permette all'organismo di interagire con l'esterno. Vi sono diversi meccanismi che ci permettono di riconoscere le forme degli oggetti e delle molecole: gli oggetti vengono riconosciuti dagli organi di senso, le molecole (virali, batteriche etc.) dal sistema immunitario.

La sopravvivenza dell'organismo dipende dall'abilità di saper riconoscere e processare una complessa varietà di stimoli interni ed esterni: responsabili dell'omeostasi dell'organismo sono il sistema neuroendocrino e il sistema immunitario. Questi tre sistemi molto probabilmente hanno un'origine comune e si sono evoluti insieme, integrandosi reciprocamente. Possiamo quindi riconoscere diversi livelli di integrazione :

- **ormoni e neurotrasmettitori**, che possono legarsi a recettori presenti nel sistema immunitario (questo può parzialmente spiegare perché una persona stressata, ovvero con alti livelli di ormoni quali l'ACTH, sia più suscettibile alle malattie infettive);

- **citochine**, che agiscono sulle cellule neuroendocrine modulandone l'attività (si pensi soltanto al ruolo dell'interleuchina-1 nell'induzione della febbre) Possono essere prodotte inoltre dalle cellule nervose ;

- fattori rilasciati dall'ipotalamo, che inducono il sistema immunitario a produrre **neuropeptidi**.

Il linfocita può quindi essere considerato una cellula neuroendocrina a tutti gli effetti in quanto è stato dimostrato che esso produce ormoni (ACTH, GH, PROLATTINA, b-ENDORFINE) ed ha recettori per alcuni di essi.

COMPONENTI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Come tutte le cellule del sangue, le cellule del sistema immunitario derivano da un precursore comune, a livello del midollo osseo. Da esso originano due linee, una che dà gli eritrociti (che non sono argomento di questo corso) e uno che dà origine ai leucociti.

Da un progenitore mieloide comune prendono origine tutte le cellule dell'immunità naturale: granulociti (neutrofili, basofili, eosinofili) e monociti/macrofagi (i macrofagi derivano dai monociti e al contrario di questi ultimi non si trovano nel sangue ma nei tessuti). Le cellule dell'immunità naturale garantiscono la prima risposta immunitaria, che non necessita di previo contatto con l'antigene ed è aspecifica.

Da un progenitore linfoide comune prendono origine invece i linfociti T e B. Queste sono le cellule responsabili della risposta immunitaria specifica, che al contrario di quella naturale richiede un certo lasso di tempo e agisce esclusivamente contro il particolare antigene con cui si è entrati in contatto.

I linfociti T sono così chiamati perché si sviluppano nel Timo; quest'organo ha un ruolo centrale nel processo di selezione dei linfociti potenzialmente in grado di riconoscere il *non self* (cioè gli antigeni che non appartengono all'organismo). Nel timo infatti si ha massivo sviluppo, differenziamento e apoptosi di linfociti T in via di maturazione. Tale processo fa sì che dal timo escano solo linfociti T che sono in grado di riconoscere antigeni non self, ma che non riconoscono antigeni self. Dal timo fuoriescono, ed entrano in circolo due tipi di linfociti T, detti CD4 e CD8, così chiamati per via di marcatori specifici di membrana che li caratterizzano. I primi sono anche chiamati linfociti T helper e 'aiutano' le altre cellule del sistema immunitario a svolgere la loro azione principalmente mediante la produzione di molecole stimolatrici specifiche quali le citochine; i secondi invece sono detti anche linfociti citotossici e hanno la capacità di uccidere cellule in particolari condizioni che vedremo. Questa distinzione molto 'classica' è comunque vera solo in parte: anche i linfociti citotossici ad esempio possono produrre citochine....

Esiste una terza popolazione di linfociti detti **NK (natural killer)**, ritenuti inizialmente legati all'immunità aspecifica, non MHC-ristretta; vedremo tra qualche lezione che non è proprio così.

I **linfociti B** sono così chiamati dal nome di un organo caratteristico degli uccelli posto vicino alla cloaca, la Borsa di Fabrizio, sede del loro differenziamento in questa classe di vertebrati. Nei mammiferi il differenziamento dei linfociti B avviene invece a livello del midollo osseo (Bone Marrow). I linfociti B svolgono essenzialmente due azioni, ovvero presentano l'antigene e in seguito ad attivazione producono anticorpi (in questo caso si differenziano in *plasmacellule*).

STRUTTURA DI UN LINFOCITA

Il linfocita è una cellula piccola (6-10 μ m di diametro) tondeggiante, con un rapporto nucleo citoplasma fortemente spostato a favore del nucleo. La cromatina è abbastanza condensata, sono presenti pochi organelli; nei linfociti T può essere presente il *corpo di Gall* (GB), formato da lisosomi primari e una gocciolina lipidica.

In seguito ad attivazione, il linfocita va incontro ad una serie di modificazioni morfologiche: il citoplasma diventa più grande (diminuisce perciò il rapporto nucleo:citoplasma), il nucleo si sposta da un lato della cellula e aumentano gli organelli (compaiono infatti più mitocondri, lisosomi e GB, si sviluppa il Golgi). La cromatina si fa inoltre più condensata.

FORMULA LEUCOCITARIA

In un individuo sano, a fronte di circa 4,5/5 milioni di eritrociti per ml, abbiamo tra i 5000 e gli 8000 leucociti/ml.

Di questi:

- il 50-60% sono neutrofili
- il 20/40% sono linfociti
- il 5/10% sono monociti
- Meno dell'1% sono eosinofili
- Meno dello 0,5% sono basofili

Tra i linfociti, abbiamo circa il 70/80% di linfociti T (a loro volta suddivisibili in base al tipo di recettore T, in ab, che sono circa il 90% e gd che sono circa il 10%). I linfociti B sono il 10/20% e gli NK sono il 10/20%.

In totale, il numero de linfociti è mediamente compreso tra i 1,500 ed i 2,500/ml.

Questi valori sono riferiti ad individui sani adulti; con l'avanzare dell'età, o in condizioni patologiche mutano in maniera anche molto significativa.

MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE E FUNZIONALI DELLE CELLULE CHE INTERVENGONO NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

I linfociti si dividono in due famiglie: B e T. I linfociti B si trasformano in plasmacellule mentre i T in cellule effettrici (T helper o T citotossici).

La plasmacellula, divenendo più grande rispetto al linfocita B, aumenta la quantità di reticolo endoplasmico rugoso e quindi è in grado di compiere una più intensa sintesi proteica; il linfocita T effettrice, al contrario della plasmacellula, non va incontro a drammatiche modificazioni morfologiche.

Per distinguere i linfociti B dai T vengono solitamente usati gli anticorpi monoclonali.

Il linfocita caratterizzato a riposo da un metabolismo estremamente contenuto, quando incontra l'antigene presentato dall'MHC si trasforma in linfoblasto aumentando il suo metabolismo. Una volta riconosciuto l'antigene, il linfocita può avere due diversi destini: diventare una cellula di memoria (PRIMING) oppure reagire contro l'antigene. È stato dimostrato sperimentalmente che iniettando un antigene in un animale si ha la produzione di anticorpi specifici dopo alcuni giorni di latenza: questo è caratteristico della RISPOSTA PRIMARIA.

I linfociti sono cellule clonalmente ristrette in quanto riconoscono antigeni specifici: due antigeni molto simili tra loro vengono infatti riconosciuti da linfociti diversi.

Quanti linfociti specifici per un antigene possiamo trovare? Per i linfociti T, i possibili recettori sono dell'ordine di 10^{15} .

I linfociti in circolo sono già formati, sono cioè già andati incontro al processo di riarrangiamento genico che conferisce loro la specificità verso un determinato antigene; non è detto che poi vengano attivati.

La risposta primaria umorale è principalmente mediata da IgM, che hanno bassa specificità per l'antigene; si ha anche una risposta cellulo-mediata ma non molto forte.

Lo scopo della vaccinazione è proprio quello di provocare una risposta primaria ad un antigene (derivato da un patogeno) affinché, nel momento in cui l'individuo vaccinato viene a contatto col patogeno stesso, si abbia una risposta secondaria estremamente rapida ed efficiente, oltre che più specifica per il patogeno stesso. La risposta secondaria infatti, scatenata da cellule di memoria (generate durante la risposta primaria e rimaste in seguito quiescenti), è una risposta mediata da IgG, più specifiche per l'antigene stesso. Una risposta immunitaria rapida ha grande importanza soprattutto in casi come quello del tetano (tossina rapida) in cui le cellule di memoria date dalla vaccinazione sono in grado di eliminare le tossine in poche ore.

La vaccinazione aumenta la frequenza di cellule specifiche per particolari antigeni e poiché le cellule presenti sono più veloci nella risposta, aumenta anche la velocità di proliferazione in seguito al contatto con l'antigene. Quando avviene la commutazione di classe le Ig hanno maggiore affinità verso l'antigene (Es: risposta secondaria con produzione di anticorpi maggiore nell'ordine di alcuni Log).

L'attivazione dei linfociti in seguito al riconoscimento dell'antigene, richiede due segnali.

- I linfociti B riconoscono l'antigene tramite le Ig di membrana, lo internalizzano e lo elaborano (primo segnale); l'antigene è riconosciuto anche dai T helper che aiutano i B a produrre anticorpi. Questo processo avviene in tramite la secrezione di citochine da parte dei T helper (secondo segnale). Nel caso in cui mancasse il primo segnale non succedrebbe nulla, mentre se manca il secondo la cellula muore per apoptosi (vedremo in seguito i meccanismi che stanno alla base di questi fenomeni).

- I linfociti T riconoscono antigeni legati ad altre cellule dette APC (antigen presenting cells); il secondo segnale è un costimolo dato dalla stessa cellula che presenta l'antigene. Le principali cellule che presentano l'antigene sono macrofagi, cellule dendritiche e cellule B. Le cellule dendritiche sono di derivazione midollare, di forma neuritica hanno numerosi prolungamenti che permettono loro di prendere contatto con molte altre cellule.

A COSA SERVE IL SISTEMA IMMUNITARIO

In base alla teoria evolutiva possiamo affermare che ci sono stati nel tempo vari passaggi con una logica precisa: le grandi funzioni vitali sono nutrirsi e riprodursi. La fagocitosi è un momento cruciale per un organismo unicellulare: nel corso dell'evoluzione si sono mantenuti tali meccanismi.

L'immunità si è sviluppata almeno all'inizio per combattere patogeni esterni. I meccanismi si sono raffinati moltissimo nel corso dell'evoluzione. Il sistema immunitario è infatti complesso e ridondante: nel corso della evoluzione c'è stata un'azione selettiva verso molecole diverse con la stessa funzione (se un organo funziona a regime normale in caso di patologia comincia ad utilizzare le sue riserve funzionali fino a bruciarsi). Nel caso del sistema immunitario che ha una grandissima riserva funzionale, se si esaurisce, si hanno immunodeficienze; mentre se viene selezionato in modo errato si possono avere fenomeni autoimmunitari.

L'evoluzione ha portato ad una pressione selettiva sul sistema immunitario da parte di agenti patogeni. Possiamo distinguere i patogeni in 4 grandi categorie: batteri parassiti extracellulari, batteri parassiti intracellulari, virus e parassiti multicellulari quali gli elminti. Per ogni categoria il sistema immunitario ha messo a punto strategie diverse: se una cellula è infettata da un virus il S.I. può far in modo che alcune molecole intracellulari leghino componente virali, le esprimano in superficie, e vengano poi riconosciute dai linfociti T citotossici che esplicano la loro azione. Nel caso di un batterio che produce tossine il S.I. può produrre Ac, che andando in circolo, legano le tossine stesse a livello del loro sito attivo inattivandole. Nel caso di agenti patogeni intracellulari (ad esempio fagocitati da un macrofago) il S.I. può agire tramite la produzione di citochine che attivano il macrofago stesso e ne aumentano le capacità di uccidere il patogeno.

CENNI DI ANATOMIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

(AC: Per lo studio di questa parte, si consiglia vivamente di tenere sott'occhio il libro di testo. Molte figure - che non posso presentare qui per ovvi motivi di copyright - sono piuttosto carine...).

- Gli organi del sistema immunitario si distinguono in primari e secondari:

1) quelli **primari** sono la sede di origine delle cellule del sistema immunitario (negli uccelli sono Borsa di Fabrizio e timo, **nell'uomo midollo osseo e timo**). Si sottolinea che negli organi primari si trovano i veri precursori delle cellule T e B, ovvero quelle cellule in cui il DNA si trova in configurazione germinale – ovvero, non sono ancora avvenuti i riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline o del recettore dei linfociti T). L'anatomia del timo verrà trattata nei dettagli insieme all'ontogenesi e maturazione dei linfociti T (vedi capitolo relativo);

2) quelli **secondari** sono linfonodi, milza, placche del Peyer e anello di Waldeyer (tonsille adenoidi e tessuto linfatico palatino).

- LINFONODI

Ha una forma di fagiolo, con grandezza di alcuni mm e si può suddividere in tre zone:

1) Corticale o corteccia (timo-indipendente, dove sono presenti i linfociti B, a livello dei follicoli)

2) Paracorticale, dove si trovano le cellule T

3) Midollare, situata a livello centrale, dove si trovano linfociti T attivati e plasmacellule

Il linfonodo è una delle sedi in cui avviene l'incontro tra linfociti vergini e antigeni. I linfociti T e B giungono al linfonodo tramite i vasi linfatici afferenti, e si vanno a collocare nell'area paracorticale e nei follicoli, rispettivamente. Qui i linfociti che riconoscono il proprio antigene (spesso trasportato da cellule APC quali le dendritiche, che possono arrivare al LN dal vaso linfatico afferente che drena, ad esempio, un distretto cutaneo o viscerale, e comunque presentato ai linfociti dalle APC) si fermano e vengono attivati, andando incontro a un processo proliferativo; i linfociti attivati lasciano il linfonodo dopo alcuni giorni come cellule effettrici. Quelli che invece non incontrano il proprio antigene ritornano in circolo tramite il vaso linfatico efferente.

- LA MILZA

Localizzata nell'ipocondrio sinistro, pesa alcune centinaia di grammi; è composta da una capsula di tessuto connettivo da cui si dipartono trabecole che ne suddividono il parenchima. Quest'ultimo è costituito da sostanza rossa e sostanza bianca: la prima è formata da un ammassi di globuli rossi che nella milza vanno incontro a eliminazione da parte di macrofagi splenici, mentre la seconda è sede di riconoscimento dell'antigene.

Qui è presente un'arteria trabecolare dalla quale origina l'arteriola centrale (ai cui lati ci sono i *tessuti linfoidi periarteriolari*, composti da linfociti T). Dall'arteriola centrale si forma il *seno venoso* e infine la vena. I linfociti B, con centri germinativi, formano una corona intorno all'area periarteriolare detta PALS.

Una differenza tra linfonodi e milza è che in quest'ultima gli antigeni arrivano direttamente tramite il sangue e sono presentati una volta usciti dal sistema arteriolare, mentre nei linfonodi arrivano dai vasi linfatici. Per una rappresentazione schematica dell'organo si veda anche quanto riportato sui testi.

- LUME INTESTINALE-PLACCHE DEL PEYER

Le placche del Peyer si trovano tra i villi dell'intestino tenue. L'epitelio che sta sopra le placche presenta *cellule M*, cellule epiteliali specializzate nel consentire il passaggio di alcune cellule e non di altre.

La placca è data da un centro germinativo di linfociti B circondato da linfociti T che si trovano nella sottomucosa dell'intestino tenue.

Una peculiarità di questo tessuto linfoide è che gli antigeni che vi giungono non vengono processati ma passano fra le cellule M, che si aprono in modo graduale: questo è un fenomeno singolare per il sistema immunitario (che di solito prevede una processazione).

Esistono altre regioni di tessuto linfoide, che citiamo solo brevemente: Il GALT è il tessuto linfoide associato all'intestino. Il MALT è il tessuto linfoide associato alle mucose mentre il BALT è il tessuto linfoide associato ai bronchi. In tutti questi casi la struttura del tessuto è simile: abbiamo una corticale in cui sono localizzati i linfociti T e una midollare in cui si dispongono i linfociti B.

CARATTERISTICHE GENERALI DEGLI ANTIGENI

Il nome “Antigene” deriva dal greco e significa: “qualcosa **che genera** una sostanza contro....”.

Possiamo definire come antigene (Ag) **qualsiasi molecola che reagisce** con gli elementi del sistema immunitario, comprendendo sia sostanze esogene che endogene (nel caso di patologie autoimmuni).

Secondo una definizione molto generale, un Ag:

- È in grado di indurre una risposta immunitaria (ovvero di provocare la produzione di anticorpi o l'instaurarsi di una risposta cellulo-mediata)
- È in grado di reagire col sistema immunitario (S.I.)

Però, per essere più precisi, qualunque sostanza **in grado di suscitare** una risposta immune si definisce IMMUNOGENICA, e viene detta IMMUNOGENO. Bisogna quindi fare una netta distinzione operativa tra **ANTIGENE** e **IMMUNOGENO**:

L'antigene è quella sostanza **in grado di legarsi** ad uno specifico anticorpo (oppure a un linfocito T): tutti gli antigeni sono **potenzialmente** in grado di stimolare la produzione di anticorpi specifici, ma **solo alcuni sono in grado di farlo realmente**, perché la maggior parte si comportano da **APTENI** (vedi oltre), ovvero ci riescono solo se legati ad una molecola (CARRIER) che li fa diventare **immunogeni**.

Quindi, una molecola può essere antigenica (cioè può reagire con i prodotti o componenti del S.I.) ma non essere immunogenica (cioè non in grado DA SOLA di indurre una risposta immunitaria).

Quindi:

**“TUTTI GLI IMMUNOGENI SONO ANTIGENI,
MA NON TUTTI GLI ANTIGENI SONO IMMUNOGENI”.**

EPITOPO o DETERMINANTE ANTIGENICO: parte di un antigene che entra in contatto con il sito di legame di un Ac o col recettore per l'Ag delle cellule T. (Gli epitopi sono praticamente le porzioni più importanti dell'antigene, capaci di evocare la risposta immunitaria).

APTENE: molecola solitamente di piccole dimensioni in grado di agire come epitopo ma che di per sé non è in grado di evocare una risposta anticorpale.

L'aptene è quindi una molecola antigenica ma non immunogena, a meno che non sia legata ad un **CARRIER**; induce una risposta immunitaria solo nel caso in cui il S.I. sia venuto precedentemente a contatto col complesso aptene-carrier.

KARL LANDSTEINER (1921):

Iniettando in un coniglio un estratto alcolico di rene (ridotto a piccoli frammenti) di cavallo notò che l'animale non produceva Ac; ma aggiungendo all'estratto un omogenato di rene (frammenti di dimensioni maggiori) il coniglio produceva Ac.

L'importanza dell'esperimento di Landsteiner risiede comunque nel fatto di aver dimostrato che l'estratto alcolico di rene di cavallo è un APTENE, cioè non è immunogeno se inoculato da solo, ma solo se insieme a una proteina CARRIER, in questo caso l'omogenato di rene.

Da questi esperimenti Landsteiner dedusse perciò il concetto di aptene e formulò 2 regole generali:

- Gli Ac reagiscono maggiormente con apteni omologhi
- Il livello di reattività crociata verso un aptene indica il grado di specificità

(per reattività crociata si intende il fenomeno per il quale un Ac che reagisce con una determinata molecola è in grado di reagire anche con un'altra molecola ma con minore affinità: es. miocardite post-streptococcica)

Attraverso prove di sostituzione aminoacidica e cross-reattività Landsteiner ha stabilito l'importanza di alcune caratteristiche:

- POSIZIONE degli aminoacidi con cui reagisce l'Ac
- GRANDEZZA
- CARICA
- STEREOISOMERIA (stereoisomeri diversi danno risposte diverse)

Vediamo da un punto di vista più generale le

CARATTERISTICHE CHE DEVE AVERE UNA PROTEINA AFFINCHÉ FUNZIONI DA ANTIGENE:

- Peso molecolare (superiore a 5.000Da). Infatti, più una proteina è grande e complessa, più verrà spezzettata e frammentata (come vedremo, le molecole MHC hanno preferenza a legare e presentare frammenti peptidici, e non proteine intere).
- Complessità chimica
- Solubilità (necessaria per il trasporto)
- Estraneità (infatti l'Ag deve differenziarsi il più possibile dalla forma delle proteine self, altrimenti si ha l'instaurarsi di patologie autoimmuni)
- Dose di somministrazione: sotto certe dosi, molte proteine non sono in grado di provocare una risposta immune. A dosi molto alte, d'altra parte, la risposta immunitaria è inibita. In alcuni casi, dosi troppo alte o troppo basse possono indurre stati irresponsivi noti come "Tolleranza acquisita da bassa o alta dose". Le Risposte Secondarie in genere necessitano di una dose più bassa di Ag, come conseguenza dell'instaurarsi della Memoria Immunologica.
- Via di somministrazione: di solito la Via Sottocutanea è la più potente.

CARATTERISTICHE degli EPITOPI:

1. I determinanti antigenici devono essere accessibili agli anticorpi (Ac)

Nel 1960 SELA studiò l'immunogenicità di diverse catene laterali aminoacidiche legate ad uno scheletro polilisinico (il S.I. non reagisce contro polimeri di molecole identiche ripetute): se il determinante antigenico delle catene (dato da residui di ac. Glutammico o tirosina legati a polialanina) risulta inaccessibile agli Ac non si ha risposta immunitaria, risposta che compare invece in seguito allo smascheramento degli epitopi (aumentando ad esempio la distanza fra catene).

2. I determinanti antigenici possono essere continui o discontinui

Negli anni '60 A. Tassi fece degli studi su mioglobina di balena e trovò che in questa molecola di 153 a.a. erano presenti 5 regioni in grado di provocare una risposta anche dopo la frammentazione della molecola e che tali regioni risultavano essere su zone esposte e flessibili. Questi tipi di determinanti antigenici sono detti continui (o lineari) poiché dati da a.a. disposti in modo lineare, cioè uno dopo l'altro nella sequenza primaria della proteina. Esistono però altri tipi di determinanti, la cui esistenza è stata dimostrata successivamente utilizzando molecole di lisozima, detti discontinui (o conformazionali) formati da a.a che erano discontinui nella sequenza primaria, ma che diventano contigui nella struttura terziaria, perché sono portati ad unirsi grazie al ripiegamento tridimensionale della proteina. (ad es. 2 regioni legate da ponti disolfuro). Alla luce di ciò possiamo probabilmente attribuire il successo degli esperimenti di Tassi alla relativa semplicità strutturale della globina.

Gli epitopi lineari, in particolare, sono riconosciuti sia dai linfociti T che dai linfociti B mentre quelli conformazionali solo dai linfociti B.

ATTENZIONE: gli epitopi lineari sono anche conformazionali, ma non è vero il contrario; infatti l'immunogenicità di una porzione proteica dipende da come essa è presentata (potenzialmente qualsiasi porzione di una molecola può essere immunogena se presentata correttamente).

3. I Determinanti Antigeni possiedono alcuni residui più importanti di altri (EPITOPI IMMUNO-DOMINANTI).

Durante l'ipermutazione somatica gli Ac ad affinità maggiore sono quelli diretti contro epitopi dominanti (epitopi immunodominanti) mentre quelli meno affini contro epitopi più nascosti.

Nel corso di una risposta immunitaria si ha quindi una sorta di "Selezione Darwiniana" tra gli epitopi più importanti, verso i quali vengono prodotti Ac più "forti".

Da qui deduciamo che gli Ag hanno porzioni più o meno importanti e che gli epitopi immuno dominanti si trovano su porzioni idrofiliche degli Ag (perché più facilmente raggiungibili dagli Ac) piuttosto che idrofobiche. Essendo questi epitopi quelli contro cui, con maggiore probabilità, reagiranno gli Ac, anche in individui diversi, sono solitamente utilizzati per la preparazione di vaccini.

4. Mobilità del sito antigenico:

L'antigene è dotato di una certa mobilità strutturale in modo da permettere all'anticorpo di "incastrarsi" bene (ricordando un po' un meccanismo chiave-serratura, in cui però la chiave è fatta di gomma!).

Infine ricordiamo brevemente **le forze in gioco nel legame Ag-Ac (non covalente):**

- Ponti idrogeno
- Interazioni elettrostatiche
- Forze di Van der Waals
- Interazioni idrofobiche

SVILUPPO E MATURAZIONE DEI LINFOCITI B

Il **CICLO VITALE** del linfocita B avviene in 4 fasi:

- 1) la prima fase avviene a livello del midollo osseo (M.O.) con il **riarrangiamento delle Ig** (vedi lezione apposita) che vengono espresse in superficie ottenendo il *linfocita B immaturo*.
- 2) la seconda fase avviene anch'essa nel M.O. e consiste **nell'instaurazione della tolleranza**, cioè nella **selezione** del linfocita in modo che non riconosca Ag self.
- 3) nella terza fase i linfociti B lasciano il M.O. vanno in periferia; il **contatto con l'antigene non self** avviene negli organi linfoidi (linfonodi e milza) (*fase di attivazione*).
- 4) nella quarta fase il linfocita B attivato, che ha incontrato l'antigene, **si differenzia in plasmacellula** che non è più in grado di rispondere all'antigene estraneo ma secerne attivamente anticorpi. La plasmacellula può migrare nel M.O. dove secerne gli anticorpi.

FASE 1

I linfociti B originano nel M.O. da una cellula stagonale totipotente; da questa si differenzia inizialmente la *cellula pro-B precoce* in cui avviene il riarrangiamento dei segmenti DJ della catena H; nella *cellula pro-B tardiva* avviene poi il riarrangiamento VDJ della catena H. Poiché la catena L non è ancora andata incontro a riarrangiamento questa cellula non esprime alcun anticorpo in superficie. Nella *cellula pre-B* la catena m viene espressa inizialmente insieme ad una catena polipeptidica che mima la catena L permettendo così l'esposizione della catena H; questo processo innesca il riarrangiamento VJ della catena L. Nella cellula B immatura vengono così prodotte IgM funzionali espresse in superficie.

Affinché avvenga questo processo sono indispensabili le cellule stromali del M.O. La cellula pro-B immatura, infatti, per potersi ulteriormente differenziare deve essere legata attraverso una molecola di adesione (CD44) a cellule stromali. La cellula pro-B precoce in seguito a questo stimolo esprime una molecola, il **c-Kit** che a sua volta si lega al c.d. **c-Kit ligand** (da molto identificato come lo stem cell factor, SCF, il fattore di crescita staminale), prodotto dalla cellula stromale; la cellula pro-B tardiva così generata si lega alla cellula stromale grazie a CD44, c-Kit e all'IL-7, fondamentale per la maturazione del linfocita pro-B; in questa fase si ha proliferazione cellulare.

Nella cellula pre-B diminuiscono i recettori per IL-7, e compaiono diverse molecole di adesione. Si giunge così ad una cellula B immatura svincolata dalla cellula stromale, che esprime IgM.

Durante lo sviluppo dei linfociti B vengono espressi diversi marcatori specifici che permettono di identificare i diversi stadi della maturazione:

- CD45RA e CD19: antigeni di superficie importanti per l'attivazione della cellula e la proliferazione, che permangono fino al linfocita B maturo;
- CD40: caratteristico della cellula pro-B precoce, ma resta espresso sempre fondamentale per la cooperazione tra linfocita B e Th;
- catena μ : compare a partire della cellula pre-B
- IgM, IgD: caratteristici della cellula B matura.

Lo sviluppo dei B dipende dal riarrangiamento sequenziale dei geni delle Ig:

- cellula pro-B precoce: su entrambi i cromosomi riarrangiano i segmenti DJ. Se questo è produttivo si ha:
- cellula pro-B tardiva: riarrangiano i segmenti VDJ su di un solo cromosoma; se il riarrangiamento non è produttivo si ha il riarrangiamento sul secondo cromosoma. Se anche questo non è produttivo la cellula muore; se uno dei due riarrangiamenti ha successo la cellula diventa

- cellula pre-B: avviene il riarrangiamento della catena leggera. Per primo avviene il riarrangiamento del gene k prima su un cromosoma ed eventualmente (in caso di riarrangiamento non produttivo) anche sull'altro. Se nessuno dei due ha successo riarrangia il gene λ sul primo cromosoma ed eventualmente sul secondo; se nessuno di questi ha successo la cellula muore.
- cellula B immatura: in questa fase si ha espressione di Ig M mature in grado di fungere da recettori.

Ogni passaggio esclude l'altro.

Lo stato maturativo dei linfociti B è valutato anche dalla diversa espressione durante il riarrangiamento di alcune proteine. Ci sono in particolare i fattori trascrizionali E2 e OCT2 espressi in tutte le fasi; RAG1 e RAG2 espressi solo negli stadi pro-B precoce, tardivo e pre-B; la TdT è espressa solo nelle prime due fasi; NF-KB è presente solo nella fase pro-B tardiva. Le proteine VpreB e $\lambda 5$ che mimano la catena L sono espresse nelle fasi precoci dello sviluppo e sono presenti sino allo stadio pre-B.

Come inizia il riarrangiamento genico delle Ig: nella linea germinale la cromatina è chiusa e non produce nessun m-RNA; esistono punti del DNA in cui arrivano proteine che legandovisi inducono l'apertura della cromatina; questi punti sono il promotore e l'intensificatore. La cellula pro-B precoce produce una proteina che si lega all'intensificatore del DNA vicina ai geni J: si ha l'apertura della cromatina, la trascrizione e la cellula pro-B tardiva presenta l'intensificatore a monte del DJ; si ha l'aumento della trascrizione e quando la cellula pro-B ha formato la catena, l'intensificatore ed il promotore sono vicini con interposto in segmento VDJ.

Il riarrangiamento produttivo della catena H blocca ulteriori riarrangiamenti H e stimola le catene L.

Sul linfocita B maturo per *splicing* alternativo vengono espresse IgM ed IgD.

FASE 2

Nel M.O. avviene la selezione per gli antigeni self con la formazione di un repertorio tollerante verso il self.

In seguito alla SELEZIONE del linfocita B immaturo si possono avere tre condizioni:

- se la cellula è in grado di legare antigeni self (es: complesso maggiore di istocompatibilità) muore per apoptosi dovuta a delezione clonale;
- se il linfocita B riconosce antigeni self solubili (es: proteine), pur restando vivo non si attiva ma rimane in uno stato di "paralisi funzionale", o ANERGIA;
- se invece il linfocita B immaturo non riconosce antigeni self può maturare e passare in periferia.

Dinamica di popolazione delle cellule B:

Midollo osseo: produzione di cellule B è vasto repertorio è induzione tolleranza

Periferia: repertorio tollerante verso il self è cellule B non stimulate

POSSIBILITA':

Nessun antigene / Stimolazione antigenica specifica

Morte B / formazione della plasmacellula

Cellula B / formazione della memoria

FASE 3

I linfociti, attraverso il sangue, arrivano ai linfonodi dove possono avvenire 2 fenomeni:

- il linfocita B non incontra nessun antigene; passa in un follicolo primario e prosegue uscendo attraverso i linfatici efferenti nel sangue e tramite il dotto toracico continua la sua perlustrazione;
- il linfocita B incontra un antigene specifico, si lega e si porta al follicolo primario dove genera follicoli secondari con un centro germinativo, fino a divenire plasmacellula; questa può rimanere nel linfonodo o abbandonarlo attraverso linfatici efferenti e portarsi nel M.O. dove si localizza e inizia a secernere Ig.

Gli anticorpi prodotti dalla plasmacellula eliminano l'antigene; possono rimanere linfociti B di memoria per risposte secondarie.

Durante la terza fase si ha l'attivazione dei linfociti B, a livello dei follicoli, attraverso **la cooperazione con i linfociti T helper (Th)**.

Il Th esprime sulla superficie il CD40 ligand che si lega al CD40 espresso dal linfocita B: questo legame permette l'innesco dell'attivazione del linfocita B che prosegue solo se il Th si lega al linfocita B attraverso il TCR. Il linfocita B specifico per l'antigene presenta MHC di classe II che espone il peptide proveniente dall'antigene che è riconosciuto dal TCR del Th che produce citochine quali IL4, IL5, IL6 che inducono l'attivazione del linfocita B.

Le citochine prodotte dai Th inducono lo scambio di classe e la proliferazione (ipermutazione somatica) del linfocita B che può diventare :

- plasmacellula che produce attivamente anticorpi progressivamente più affini per l'antigene;
- cellula B di memoria che permane per lungo tempo in circolo e si attiva ogni volta che incontra lo stesso antigene (risposta secondaria).

L'ipermutazione somatica è un processo casuale che può generare anche anticorpi con affinità inferiore: esiste perciò un processo di selezione dei linfociti più affini, regolato dalle cellule follicolari dendritiche del linfonodo; l'interazione di queste cellule con i linfociti B è garantita dall'antigene CD23 con CD19 presente sui linfociti B stessi. Se la mutazione ha originato una Ig con minore affinità quest'ultima legherà con difficoltà l'antigene e il linfocita B non verrà più stimolato. Se si è originato un anticorpo con affinità intermedia per l'antigene, avviene l'interazione tra linfocita B e cellula dendritica tramite il legame del CD23 e CD19 e antigene-anticorpo di membrana. Questa doppia interazione incrementa l'espressione del gene **bcl2** fondamentale per bloccare il processo apoptotico. Se in fine si origina un anticorpo con elevata affinità si avranno molte interazioni antigene-anticorpo e CD23 - CD19 tra linfocita B e cellula dendritica. I livelli di bcl2 saranno più elevati e la cellula darà un contributo dominante.

FASE 4

Le plasmacellule differenziate negli organi linfoidi, si recano al M.O. dove danno inizio ad una massiccia produzione di anticorpi; in questo caso non possono rispondere né all'antigene né ai linfociti T; la sopravvivenza di tali cellule è limitata ed è legata alla permanenza dello stimolo antigenico ed alla presenza di fattori di crescita prodotti, ad esempio, dalle cellule stromali del midollo. Le plasmacellule non esprimono MHC di classe II, non sono in grado di dividersi, non danno ipermutazione somatica né scambio di classe.

GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLE IMMUNOGLOBULINE (IG)

- Il dominio variabile delle immunoglobuline (Ig) ha, come tutti i domini appartenenti alla famiglia delle Ig, una struttura secondaria di tipo β , formata da due foglietti contrapposti. Il massimo della variabilità all'interno del dominio V (da **Variable**) è concentrata in tre *regioni ipervariabili*, che sono anche le regioni che prendono contatto con l'antigene, chiamate **CDR1, CDR2, CDR3** (da **Complementary Determining Region**).

Nella struttura tridimensionale del dominio V, queste tre regioni corrispondono a loops di collegamento tra diversi filamenti β . Poichè in una proteina i loops sono le regioni più permissive a sostituzioni aminoacidiche, un alto livello di variabilità in queste regioni, pur permettendo di avere molte strutture diverse per contattare l'antigene, non compromette il mantenimento della struttura secondaria e terziaria della proteina.

- Esiste un *locus* genico codificante per la catena pesante (*locus* H) e due per la catena leggera (*loci* λ e κ). Nel genoma del topo e nell'uomo sono così disposti:

Gene	Topo	Uomo
H (heavy)	Cromosoma 12	14
Lambda	16	22
Kappa	6	2

La regione costante in tutti e tre i *loci* è codificata da sequenze del tutto simili nell'architettura a quelli di altri geni.

- Le **caratteristiche peculiari** di questi geni **sono concentrate nella parte codificante per i domini variabili**. La regione variabile infatti non è codificata da uno o più esoni, come nei normali geni eucarioti, **ma da diversi tipi di segmenti genici, ognuno codificante per una parte del dominio**, che vengono uniti fra di loro in un processo detto di **ricombinazione somatica**. In ognuno dei tre *loci* esistono più copie di ogni tipo di segmento genico.

Nella catena leggera κ , i primi 96 aa del dominio variabile sono codificati dal segmento V e i restanti 14 dal segmento J (da **Joining**). Nel topo vi sono circa 250 segmenti V e 5 segmenti J, di cui solo 4 funzionali (il quinto è perciò uno pseudogene).

Nella catena λ vi sono 3 J e 2 V funzionali.

Nel locus H, il dominio V è invece codificato da tre diversi tipi di segmenti genici: vi sono 200-1000 V, 4 J, e 15 D (da **Diversity**) i quali codificano per aa interposti fra i primi (codificati dal segmento V) e gli ultimi codificati dal segmento J.

- Il processo di ricombinazione somatica è un processo di ricombinazione del DNA (comporta quindi tagli e giunzioni di DNA) che avviene in cellule somatiche (linfociti B e T); lo scopo di tale processo è quello di generare a partire da un numero limitato di segmenti genici a disposizione, per dare come risultato l'enorme variabilità idiotipica degli anticorpi. Il processo di ricombinazione associa, nel caso della catena leggera, un segmento V scelto casualmente con un segmento J anch'esso scelto casualmente. Un meccanismo del genere è in grado di generare nel caso del locus κ :

$250 \times 4 = 1.000$ combinazioni diverse.

Un discorso simile può essere fatto per il locus λ : le combinazioni possibili sono però solo $3 \times 2 = 6$.

Nel locus H le possibili combinazioni sono molto maggiori perché nel processo di ricombinazione vengono associati tre diversi tipi di segmenti. Se ipotizziamo un numero di geni $V=1.000$, le combinazioni possibili sono:

$$1.000 \times 4 \times 15 = 60.000.$$

Poiché la ricombinazione è un processo indipendente per catena leggera e pesante il numero possibile di anticorpi diversi così generabile è (ipotizzando un Ac con la catena leggera codificata dal locus k):

$$60.000 \times 1.000 = 6 \times 10^7$$

Questo valore è però ancora lontano dalla stima di diversità idiotipica data per gli ac (10^{15}). Vedremo come esistono altri meccanismi che incrementano variabilità possibile.

- Il meccanismo di ricombinazione avviene grazie ad un complesso di enzimi che sono in grado di riconoscere i segmento da ricombinare grazie a delle sequenze conservate poste immediatamente al di fuori dei segmenti genici stessi.

- Nel caso del locus κ , i segmenti V portano in 3' una sequenza eptamerica e una sequenza nonamerica conservate, separate fra loro da 23 paia di basi. I segmenti J portano in 5' una ancora le sequenze eptameriche e nonameriche conservate ma spaziate da 12 paia di basi.

- Nel caso del locus λ , la situazione è simile, ma la spaziatura fra eptamero e nonamero è di invertita: 12 paia di basi per i segmenti V e 23 per i segmenti J.

- Nel caso del locus H, la situazione è più complessa: i segmenti V hanno in 3' un eptamero e un nonamero separati da 23 paia di basi, i segmento J hanno in 5' un eptamero e un nonamero spaziate da 23 paia di basi, mentre i segmenti D hanno sia in 5' che in 3' le due sequenze conservate separate da 12 paia di basi.

- Durante la ricombinazione, ognuna di queste sequenze svolge un preciso ruolo: l'eptamero, posto sempre dalla parte codificante, indica il sito in cui deve avvenire il taglio; il nonamero, posto dalla parte non codificante, indica la parte di sequenza che andrà eliminata. Le sequenze spaziatrici hanno invece lo scopo di impedire ricombinazioni non corrette (come ad esempio fra segmenti genici dello stesso tipo o, nel caso del locus H, ricombinazione diretta fra segmenti V e J senza in mezzo segmenti D).

La ricombinazione è infatti permessa solo fra segmenti le cui sequenze poste alle estremità presentano spaziature fra eptametro e nonamero di lunghezza diversa. Sono permesse quindi ricombinazioni fra segmenti J e V nei loci κ e λ , ma non nel locus H dove questi tipi di segmenti presentano entrambe sequenze spaziatrici di 23 paia di basi.

Nella reazione di ricombinazione sono coinvolti molti diversi enzimi, detti nel complesso "recombinasi"

Negli anni 90 sono stati identificati due geni (RAG1 e RAG2) i cui prodotti sono essenziali per la ricombinazione: questi enzimi sono in grado di riconoscere le sequenze conservate viste in precedenza, intervengono nel processo di taglio e giunzione del DNA. Il loro knock out nel topo porta ad un fenotipo di tipo SCID (immunodeficienza severa combinata): la ricombinazione in loro assenza non avviene mai e il topo, non sviluppando linfociti B e T non ha alcuna forma di difesa immunitaria specifica.

RAG1 e RAG2 non sono però i soli geni essenziali per tale processo: in certi casi di topi SCID è stato notato che la mutazione genetica responsabile del fenotipo osservato non mappa nella stessa posizione dei geni RAG1 e RAG2.

- Il meccanismo di ricombinazione comporta la formazione di un loop nel DNA che porta ad affiancare le sequenze eptameriche e nonameriche conservate poste immediatamente al di fuori dei segmenti oggetto della ricombinazione.

Il DNA è tagliato fra l'eptamero e la parte codificante (sia essa V, D o J) le due estremità libere dei due eptameri sono unite fra loro, dando così un frammento di DNA circolare che andrà poi perduto. Le altre due estremità rimaste libere (estremità codificanti) sono invece unite fra di loro.

Quest'ultima tappa non avviene direttamente: in un primo tempo le alle due estremità codificanti viene formata una forcina unendo l'ultimo nucleotide di un filamento col primo del filamento complementare tramite un normale legame fosfodiesterico. Successivamente la forcina viene aperta tagliando una delle due eliche complementari qualche nucleotide più all'interno dell'ultima coppia di basi. Questo processo porta alla formazione di un breve tratto di DNA a singola elica sulle due estremità codificanti. I nucleotidi in più presenti sono detti nucleotidi P perchè palindromici. Le estremità sporgenti vengono riempite e, nel caso della catena pesante, un enzima, la **deossinucleotidil-transferasi terminale (TdT)**, aggiunge altri nucleotidi casuali sulle due estremità (nucleotidi N). Al termine di quest'ultima tappa le due estremità vengono finalmente riunite fra loro.

- L'aggiunta casuale di nucleotidi aumenta di molti ordini di grandezza (10^5 - 10^8) la variabilità generabile. Il numero di nucleotidi aggiunti è casuale: se risulta diverso da tre o dai suoi multipli, questo genera un frame-shift (spostamento) di lettura che rende non funzionale la ricombinazione generata (ricombinazione non-produttiva). Per semplici ed intuibili ragioni di probabilità, questo succede nel 66% dei casi.

La ricombinazione può però essere tentata due volte per la catena pesante e quattro per la catena leggera: esistono due *loci* H (su due cromosomi fratelli), due *loci* per la catena leggera λ e due per la catena leggera κ .

Nel caso della catena leggera inoltre, in ambedue i *loci* sono possibili più tentativi di ricombinazione, essendo solo due i segmenti da ricombinare. Questo non è possibile nel caso della catena pesante, perchè la ricombinazione fra i segmenti DJ uniti fra loro nel primo tentativo e il segmento V porta all'eliminazione di tutti i segmenti D rimasti, necessari per successivi eventuali tentativi.

- Per far sì che un linfocita B esprima solo una catena leggera e una pesante, esiste un meccanismo, detto di **esclusione allelica** che in seguito al successo della ricombinazione su un cromosoma, blocca la ricombinazione su tutti i loci che potrebbero portare ad esprimere la stessa catena (se un *locus* H ricombina con successo, la ricombinazione è bloccata sul *locus* H del cromosoma fratello; se ricombina uno dei *loci* per la catena leggera, la ricombinazione è bloccata sugli altri tre rimasti).

Esiste un preciso ordine con cui avviene la ricombinazione. Il primo riarrangiamento tentato è per la catena pesante: se non ha successo prima su un cromosoma e poi sull'altro, la cellula va incontro ad apoptosi (sarebbe una linfocita B inutile, perchè non in grado di esprimere anticorpi funzionali).

Se invece la ricombinazione su uno dei *loci* H ha successo, inizia la ricombinazione per la catena leggera, prima sul *locus* κ e poi, se falliscono i due tentativi, sul *locus* λ . La tappa limitante del processo è la ricombinazione della catena pesante: quando questa ha successo, la cellula giunge poi nel 95% dei casi ad esprimere un anticorpo funzionale.

- Vediamo ora la **variabilità isotipica** dell'anticorpo. Esistono diverse classi di anticorpi, ognuna delle quali ha dei precisi ruoli all'interno del sistema immunitario. Un linfocita B può nel corso della sua vita esprimere in successione diverse classi di anticorpi. Il processo che determina il passaggio dall'espressione di una classe ad un'altra è detto **switch di classe**, ed è ancora una volta un processo di ricombinazione di DNA.

La regione costante della catena pesante è codificata da diversi esoni (sei nel caso della catena μ). Nel locus H esistono vari segmenti C ognuno corrispondente a una delle diverse classi di Ig. Nel caso dell'uomo ci sono due $C\alpha$, $4C\gamma$, $C\mu$, $C\delta$, $C\epsilon$. Inizialmente dalla cellula vengono espresse IgM perché il $C\mu$ è il più vicino alla regione VDJ riarrangiata e quindi viene trascritto assieme ad essa, e poi tradotta.

Circa 2 kb a monte dei vari segmenti C ci sono sequenze, dette sequenze di scambio (S) lunghe da 1 a 10 kb e caratterizzate da una sequenza conservata e ripetuta molte decine di volte. Tali sequenze sono le sequenze che permettono un processo di ricombinazione del DNA, che porta ad avvicinare una diversa regione C ai segmenti VDJ riarrangiati e contemporaneamente all'eliminazione della regione di DNA interposta. In questo modo la parte codificante per le regioni C presenti in questa regione va eliminata e la regione C avvicinata ai segmenti VDJ viene trascritta e quindi espressa. Il processo di switch è perciò irreversibile. Di norma avviene un solo switch, ma ne sono teoricamente possibili molti in sequenza e un linfocita B esprime una sola forma di Ig per volta.

L'unica eccezione riguarda le IgD che sono coespresse con le IgM. la regione per le IgD non ha sequenze di scambio a monte. la regione Cd è trascritta assieme a Cm. La trascrizione in questo caso può terminare in due punti diversi. Se termina dopo $C\mu$, vengono prodotte IgM; se termina dopo $C\delta$, lo splicing successivo elimina la parte codificante per $C\mu$ e vengono prodotte IgD. L'intero processo di switch di classe è antigene dipendente (avviene dopo l'incontro con l'antigene); le caratteristiche dell'antigene possono anche influenzare il tipo di switch.

Il passaggio da forma di membrana a forma solubile dell'Ig è anch'esso un fenomeno di splicing alternativo. Il gene $C\mu$ ha sei esoni gli ultimi due dei quali (M1 e M2) codificano per il dominio trans membrana della proteina. Se la trascrizione termina dopo questi esoni, essi vengono inseriti nell'mRNA maturo e la proteina diviene di membrana. Se invece la trascrizione termina prima, gli ultimi due esoni non sono inseriti nellaproteina e l'Ig viene secreta.

- Processo di *ipermutazione somatica*

L'interazione antigene anticorpo è di tipo non covalente; i primi anticorpi prodotti da un linfocita B mostrano una bassa affinità per il suo Ag. Dopo l'incontro con l'antigene e la stimolazione del linfocita B da parte dei T helper, nella cellula B cominciano a verificarsi mutazioni ad una frequenza insolitamente elevata (fino a 10^{-4}) nelle regioni di DNA codificante per i domini variabili. Le mutazioni sono casuali, ma solo i linfociti B in cui avvengono mutazioni che aumentano l'affinità per l'antigene sopravvivono. Esiste infatti una competizione tra Anticorpi solubili e anticorpi di membrana del linfocita per il legame con l'antigene. Poiché il legame, la successiva processazione e la presentazione dell'Ag ai linfociti T helper sono essenziali per la sopravvivenza del linfocita B, solo le cellule che legano bene l'Ag (con anticorpi quindi con affinità per esso superiore a quello degli anticorpi in circolo) sono efficientemente stimulate e sopravvivono, mentre le altre vanno incontro a morte.

IL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ (MHC)

La sigla MHC sta per *complesso maggiore di istocompatibilità*; il nome deriva dal fatto che è stato identificato inizialmente nello studio del rigetto dei trapianti. Questa sua caratteristica è però una conseguenza secondaria del ruolo reale dell'MHC nel sistema immunitario.

DEFINIZIONE:

Per MHC si intende una *regione di geni altamente polimorfici i cui prodotti sono espressi da una gran varietà di cellule, che giocano un ruolo centrale nel meccanismo di risposta immunitaria ad antigeni proteici*.

I prodotti di questi geni infatti forniscono il sistema per rendere riconoscibili peptidi antigenici ai linfociti T. In altre parole, servono per *presentare* l'antigene al linfocita T.

CARATTERISTICHE:

Nella popolazione esistono diverse forme alleliche nell'MHC ognuno dei quali può avere una diversa capacità di legare e presentare determinati antigeni proteici; se un peptide non si lega a nessun MHC le cellule T non possono rispondere ad esso, dato che essi riconoscono antigeni solo se esposti sulla superficie di un'altra cellula. I linfociti T infatti *non riconoscono antigeni solubili*. Esistono due diverse classi di molecole MHC (I e II) con struttura a ruoli diversi; l'associazione dell'antigene con il tipo di MHC (classe I o II) determina il tipo di linfocita T coinvolto nella risposta immunitaria (CD8 o CD4, rispettivamente). Questo perché il CD4 si lega all'MHC di classe II mentre il CD8 si lega all'MHC di classe I.

La presenza di due diverse classi di MHC riconosciute da sottopopolazioni diverse di linfociti T ha uno scopo ben preciso: gli antigeni endogeni infatti sono presentati da MHC I e riconosciuti da linfociti T CD8+ (CTL). Poiché solitamente gli antigeni endogeni non self derivano da infezioni virali, il sistema immunitario ha adottato questo tipo di strategia per poter riconoscere cellule infette da virus e di ucciderle (l'azione dei linfociti T CD8+ è infatti citotossica), eliminando così la sorgente di produzione dell'agente infettivo. L'MHC di classe I è perciò posseduto praticamente *da tutte le cellule nucleate*, che sono tutte teoricamente infettabili.

Gli antigeni esogeni (es: tossine) devono invece essere prima endocitati e poi degradati per essere presentati tramite MHC II. L'MHC II presenta antigeni a linfociti CD4+ che di solito *hanno una funzione di Helper*: si ha così produzione di molecole (citochine) che aiutano la risposta immunitaria. Un esempio tipico di questo meccanismo è la situazione in cui i linfociti B legano l'antigene, lo processano, e lo presentano ad un T helper. Quest'ultimo produce citochine che stimolano lo stesso linfocita B a maturare, quindi produrre anticorpi che, entrati in circolo, legano l'antigene che poi verrà eliminato. Si ha così un meccanismo di eliminazione "a distanza" dell'antigene.

STORIA DEGLI STUDI SULL'MHC:

Lo studio e la scoperta delle caratteristiche dell'MHC ha attraversato tutto questo secolo; la sua identificazione è stata in realtà conseguenza secondaria di studi che intendevano inizialmente andare in altre direzioni (ricerca su tumori prima e trapianti poi).

Inizio 1900, primi studi sui tumori sperimentali: si notò che l'unico possibile trapianto di tumore era quello in topi singenici (topi inbred: identici dal punto di vista genetico). Alcuni ceppi erano sensibili al trapianto da ceppi diversi, mentre altri erano resistenti.

L'ipotesi iniziale (rivelatasi poi sbagliata) era che i geni per la resistenza ai tumori codificano per strutture importanti per la risposta immunitaria.

Nel 1933 Haldane scoprì che questa risposta immunitaria non era rivolta contro antigeni tumorali ma verso antigeni tissutali che hanno tutte le cellule, comprese quelle neoplastiche. L'ipotesi concordava perfettamente con la scoperta degli antigeni sanguigni umani di Landsteiner.

Nel 1948 Snell realizzò uno studio di genetica formale per gli antigeni responsabili del rigetto dei trapianti nel topo (antigeni di istocompatibilità o H). Lo studio fu fatto utilizzando topi congenici, caratterizzati da un patrimonio genotico identico con un solo gene diverso, appunto quelli di istocompatibilità. Alla fine dello studio Snell identificò gli stessi loci genici che aveva individuato Gorer qualche anno prima.

All'inizio degli anni '60 Jean Dausset iniziò studi analoghi sull'uomo. Si osservò che pazienti che rigettavano trapianti avevano reazioni trasfusionali, cioè avevano anticorpi circolanti che reagivano contro globuli bianchi del donatore.

Concetto di *alloantisiero*: siero con anticorpi che riconoscono alloantigeni, ovvero antigeni presenti in altri individui della stessa specie.

La ricerca si indirizzò perciò verso lo studio di geni responsabili di tale fenomeno. Fu utilizzato a tale scopo un pannello di antisieri ottenuto da: **multipare, pazienti trapiantati, soggetti politrasfusi, volontari immunizzati**. Questo studio portò all'identificazione di sei distinti loci antigenici, in una stessa area del genoma che codifica per loci MHC.

Negli anni '70 Zinkernagel e Doherty scoprirono il fenomeno della restrizione per MHC (vedi capitolo sulla citotossicità), che porterà in seguito (alla fine degli anni 80) alla scoperta dei meccanismi fini di processazione dell'antigene.

NOMENCLATURA

Nell'uomo i prodotti dei loci genici dell'MHC prendono il nome di HLA (human leukocyte antigens). L'identificazione dei loci genici e dei corrispettivi prodotti fu sierologica per alcuni tipi (A, B, C, ovvero i prodotti di classe I) e ottenuta con altre tecniche (colture miste linfocitarie) per altri HLA (DP DQ DR, ovvero molecole di classe II).

STRUTTURA DEI GENI MHC

L'MHC è situato nel braccio corto del cromosoma 6. In questa regione (2-3 cM, circa 4×10^6 paia di basi) si trovano circa un centinaio di geni. Il gene per la β_2 microglobulina, una catena polipeptidica costante che si associa all'MHC di classe I, è localizzato al di fuori dell'MHC, sul cromosoma 15.

Concetto di **POLIGENISMO**: esistono tre geni MHC di classe I (A,B,C) e 8 geni MHC di classe II. I più importanti per quest'ultima sono: HLA-DP (catene α e β) HLA DQ (α e β) HLA DR (α e β).

Concetto di **POLIMORFISMO**: Esistono molte varianti alleliche della stessa molecola. Ad esempio, fino all'inizio del 1998, nelle popolazioni caucasiche, erano stati identificati:

HLA-A: 59 alleli

HLA-B: 111

HLA-C: 37

HLA-DP: 8 alleli per la catena α , 62 per la β

HLA-DQ: 16 α , 25 β

HLA-DR: 1 α , 122 β

I geni MHC sono **codominanti**, vengono cioè espressi i prodotti proteici dei geni dell'MHC sia di un cromosoma che dell'altro. Ogni individuo possiede perciò un "patrimonio" di molecole MHC che sono derivate metà dal padre, metà dalla madre. L'insieme di tutte queste molecole è definito **APOTIPO**.

Nell'uomo alcuni alleli HLA sono più frequenti di altri. Esiste infatti una **pressione selettiva** che nel corso dell'evoluzione ha determinato una aumentata frequenza di alcuni alleli HLA, **al di fuori dell'equilibrio di Hardy-Weinberg**, in certe zone del mondo. Ad esempio,

Il **vantaggio evolutivo** del **polimorfismo** e del **poligenismo** risiede nel fatto che è maggiore la possibilità di avere combinazioni diverse di alleli che possono presentare in maniera ottimale un determinato antigene, quindi di poter presentare il maggior numero di peptidi diversi ai linfociti T.

L'MHC di classe I viene espresso da **tutte le cellule nucleate**; è facilmente inducibile dall'IFN- γ che è prodotto in caso di infezione virale. In questo modo è favorita la presentazione dell'antigene e la conseguente morte della cellula infetta. I globuli rossi, in quanto cellule non nucleate, non esprimono MHC di classe I e presentano molto male antigeni di ospiti intracellulari quali, ad esempio, il *Plasmodium falciparum*, agente causale della malaria.

L'MHC di classe II è invece espresso dalle cellule che presentano l'antigene (monociti e macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B e solo in parte T).

MHC PARTE II

RUOLO NELLA PRESENTAZIONE E PROCESSAZIONE DELL'ANTIGENE

Rivediamo prima la struttura dell'MHC.

L'MHC di classe I è formato da due catene polipeptidiche, ambedue appartenenti alla superfamiglia delle Ig.

La prima, nota come β_2 **microglobulina**, è costituita da circa 100 aa, del peso di 12 Kda, monomorfica, e ha un ruolo nel mantenimento della struttura tridimensionale del complesso dell'MHC, ma non partecipa al processo di presentazione dell'antigene.

La seconda, detta **catena** α , è quella che lega l'Ag e prende contatto con TCR e CD8. La catena α è formata da tre domini extracitoplasmatici Ig-like, detti $\alpha 1$ $\alpha 2$ ed $\alpha 3$, ognuno formato da circa 90 aa, da un dominio transmembrana di circa 25 aa e da un dominio intracitoplasmatico di circa 30 aa; il peso complessivo della proteina è di circa 40 Kda. Il peptide è legato dai domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$. L'MHC I come pure l'MHC II lega brevi peptidi derivati dalla processazione dell'Antigene (vedremo poi in che modo). Poichè il linfocita T riconosce l'Ag solo se legato all'MHC, ne consegue che non può riconoscere antigeni conformazionali, come invece può fare un linfocita B: le strutture riconosciute legate da un certo TCR sono cioè necessariamente contigue.

L'MHC II è formato anch'esso da due catene polipeptidiche, ambedue appartenenti alla superfamiglia delle Ig, che però sono simili nella struttura e partecipano in egual modo al legame del peptide. Le **due catene, dette** α e β , hanno un peso molecolare rispettivamente di 34 e 29 Kda. La catena α è formata da due domini extracellulari, detti $\alpha 1$ e $\alpha 2$ di circa 90 aa ognuno, da un dominio transmembrana di 25 aa e da un dominio intracellulare. La catena β è molto simile nella struttura: ha anch'essa due domini extracellulari $\beta 1$ e $\beta 2$ di 90 aa circa, un dominio transmembrana e uno intracellulare. Il peptide è legato nella tasca formata dai due domini $\alpha 1$ e $\beta 1$.

Avevamo visto in precedenza che i geni dell'MHC sono altamente polimorfici (polimorfismo) e presenti in più copie (poligenismo). Va notato che il polimorfismo è sostanzialmente concentrato nella regione che lega il peptide, per garantire la massima variabilità di questa regione e quindi la possibilità di legare in maniera ottimale il maggior numero di peptidi diversi.

E' oggi nota la struttura in 3D dell'MHC I e II, ottenuta con metodi cristallografici. Di particolare interesse è la struttura della tasca di legame del peptide. Poichè l'MHC è stabile solo se lega un peptide, le strutture in 3D ottenute sono quelle di MHC associate ai peptidi da esse presentate. Questo ha permesso di analizzare nei dettagli anche l'interazione MHC-peptide, e le caratteristiche dei peptidi legati da un certo MHC.

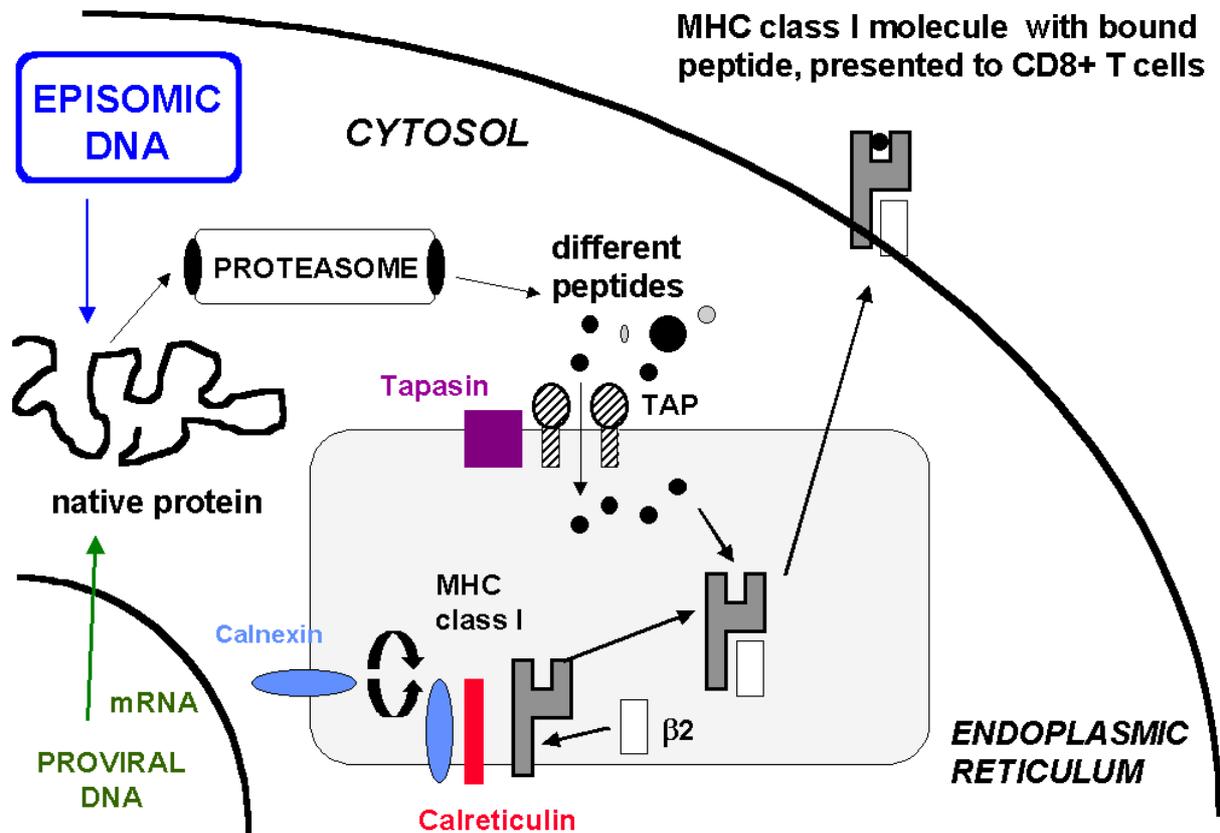
La tasca di legame ha una struttura abbastanza simile nei due tipi di MHC, malgrado sia formata in un caso da una sola proteina e nell'altro da due. La base della tasca è formata da un foglietto β antiparallelo di 8 β -strands. Sopra di esso sono poste due α eliche che formano le pareti della tasca. Le due eliche si avvicinano molto alle due estremità nell'MHC I, chiudendo così la tasca stessa. Nel caso dell'MHC II le due eliche si mantengono distanti anche alle estremità, lasciando così 'aperta' la tasca stessa. A causa di ciò, l'MHC I lega solo peptidi di lunghezza molto precisa, circa 7-8 aa, mentre nel caso dell'MHC II il peptide è di lunghezza più variabile, compresa tra i 13 e i 20 aa: in quest'ultimo caso al peptide è permesso di 'debordare' ai due lati della tasca.

L'analisi di diversi peptidi legati dallo stesso MHC, ha evidenziato come si debbano avere alcuni elementi costanti che permettono una interazione con gli aa che formano la tasca dell'MHC. Nel caso dell'MHC I, di solito si ha interazione tra i due aa N e C terminale (che presentano i gruppi NH_3^+ e COO^-) e aa di carica opposta presenti nella tasca. Altri residui all'interno del peptide (detti *residui di ancoraggio*) permettono il legame con la tasca, tramite interazioni di vario tipo. In genere i peptidi presentano pochi residui con caratteristiche comuni in certe posizioni (aa che garantiscono l'interazione), mentre il resto della sequenza è notevolmente variabile. La variabilità dell'MHC invece è necessaria per far sì che sia possibile stabilire un'interazione con il peptide: una delle diverse forme di MHC espresse da un individuo (come risultato dei fenomeni di polimorfismo e poligenismo) sarà sicuramente capace di dare interazione con un certo peptide.

Quanto detto finora per la classe I, è valido anche per la classe II. Le uniche differenze sono nella lunghezza del peptide (fino a 20 aa), e nella minore importanza dei residui terminali, per via dell'apertura della tasca alle estremità.

PROCESSAZIONE DELL'AG E POSIZIONAMENTO DEL PEPTIDE SULL'MHC

MHC di classe I



Su MHC I sono montati peptidi endogeni. La prima tappa del processo è la processazione dell'antigene, ovvero il taglio della proteina in frammenti di 7,8 aa che verranno poi montati sull'MHC. Tale processo di digestione avviene ad opera del proteasoma, un complesso multiproteico di notevoli dimensioni presente nel citosol. E' formato da 28 subunità, disposte in 4 anelli sovrapposti di 7 subunità ciascuno, a formare una struttura cilindrica aperta alle estremità. Il taglio avviene con un meccanismo catalitico non ben noto, in maniera apparentemente casuale (non ci sono cioè siti di taglio preferenziali). La digestione genera frammenti di lunghezza e caratteristiche variabili.

I peptidi sono poi legati da due proteine, dette TAP 1 e TAP2. Queste sono poste sulla membrana del reticolo endoplasmatico e pompano attivamente i peptidi all'interno del lume, con contemporaneo consumo di ATP.

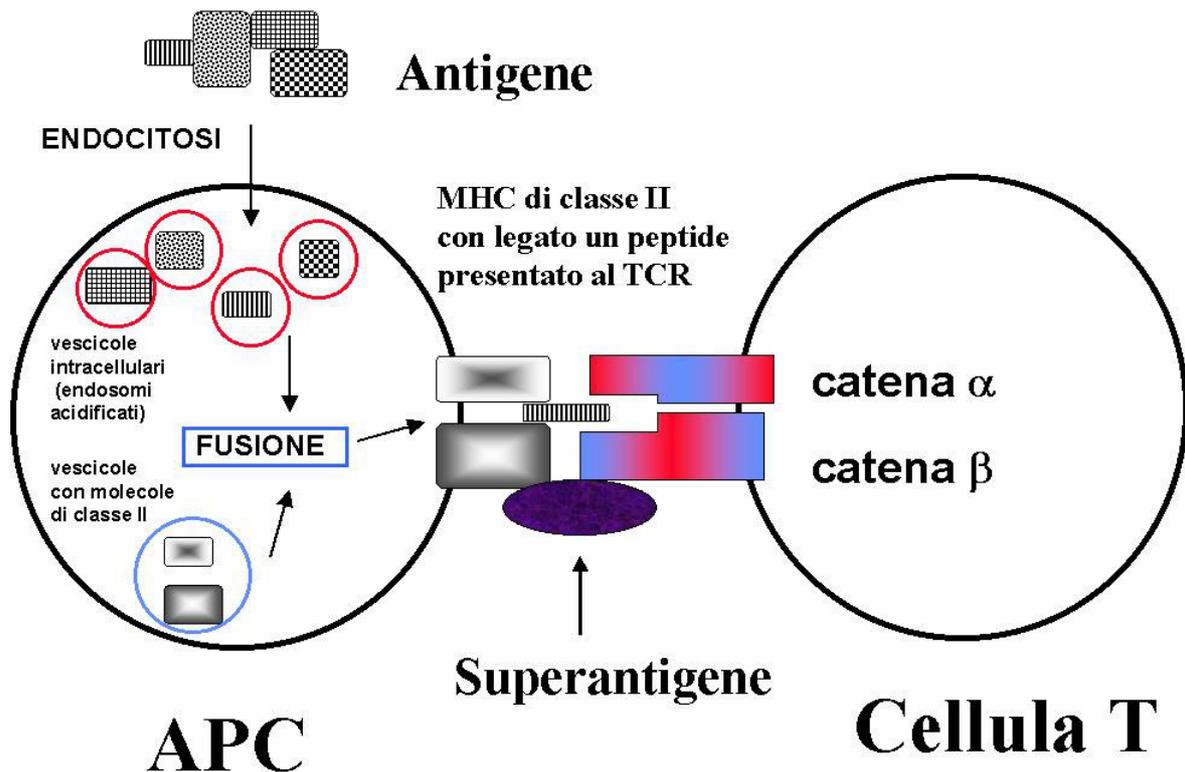
La sigla TAP sta per Trasportatore Associato alla Processazione dell'Antigene. Anche TAP 1 e 2 presentano diverse varianti alleliche, i loro geni mappano nella regione MHC, fra DM e DR, assieme ad altri geni detti LMP (che codificano per alcune subunità del proteasoma).

TAP 1 e 2 si associano a formare un eterodimero transmembrana; presentano un dominio citosolico che lega e idrolizza ATP.

Nel lume del reticolo sono presenti le molecole MHC neosintetizzate, che vengono mantenute in conformazione (parzialmente) folded da chaperonine specifiche, in particolare dalla *calnexina*.

Una seconda chaperonina, la *calreticulina*, aiuta l'associazione della β_2 M alla catena α dell'MHC, e mantiene ancora in conformazione parzialmente folded l'MHC. A questo punto avviene l'attacco del peptide, grazie all'intervento di un'altra proteina, la *tapasina*, che permette il trasporto del peptide dal canale formato da TAP1/2 alla tasca dell'MHC.

MHC di classe II



La prima tappa del processo di consiste nell'endocitosi dell'Antigene, che viene poi degradato all'interno di vescicole acidificate. Alla fine della degradazione si ha una situazione per cui in ogni vescicola c'è un solo peptide. La molecola di MHC II viene nel frattempo sintetizzata e mantenuta stabile nella conformazione folded all'interno del reticolo endoplasmatico, analogamente e quanto visto per l'MHC I. Inizialmente l'MHC II viene legato dalla calnexina, che poi lo cede alla cosiddetta *catena invariante*, la quale lega l'MHC II e occupa con una sua porzione anche la tasca di legame del peptide. L'intervento della *cathepsina L* provoca il taglio della catena invariante, che viene così distaccata dall'MHC II. Solo la parte che occupava la tasca rimane legata all'MHC; tale frammento è denominato CLIP (peptide associato alla catena invariante di classe II).

Quando la vescicola acidificata e quella contenente l'MHC II/CLIP si fondono, l'HLA DM (una forma scarsamente polimorfica di MHC II capace di legare solo alcuni tipi di peptidi, caratterizzato da un'alta affinità per il CLIP) strappa questo peptide all'MHC II e permette l'associazione di quest'ultima col peptide proveniente dalla vescicola acidificata. A questo punto la struttura matura è esposta in superficie.

Esistono infine **forme particolari** di molecole HLA specializzate in particolari ruoli. Ad esempio:

MHC classe I B

Ancora poco conosciute. Si sa che si associano anch'esse con β_2M , sono caratterizzate da scarso polimorfismo, e sono in numero variabile sia a livello interspecifico che intraspecifico. La forma H2M3 nel topo è caratterizzata dalla capacità di legare peptidi N-formilati (cioè con N formil metionina in N terminale, caratteristica questa esclusiva delle proteine procariotiche).

HLA-G

Molecole presenti nelle cellule placentali di origine fetale. Sono caratterizzate dal fatto che, pur essendo in grado di dare il segnale inibitorio alle cellule NK, non sono riconosciute da cellule CD8. Di conseguenza, il sistema immunitario materno, anche se potrebbe teoricamente riconoscere i peptidi del feto come non self, non è in grado di scatenare contro le cellule che li presentano azioni citotossiche.

Per ulteriori dettagli, si veda il capitolo apposito HLA-G a cura di Giada Zecchi.

DO (suddivise in DN α e DO β)

Sono forme non polimorfiche di MHC presenti sono nel timo e nelle cellule B. Non ne è noto il ruolo ma tenendo conto della loro espressione, si può supporre che siano coinvolte nel meccanismo di maturazione dei linfociti T e B.

CD1a (molecole MHC classe I like)

Non è un molecola polimorfica, e riconosce essenzialmente residui di acido micolico e lipoarabinomannosio (molecole tipiche dei micobatteri).

FUNZIONE DELL' HLA-G

a cura di *Giada Zecchi*

INTRODUZIONE

L'HLA-G, che fu scoperto una decina di anni fa, fu inizialmente classificato come un prodotto genico HLA, non classico, in accordo con i seguenti criteri:

- limitato polimorfismo
- ristretta distribuzione tissutale
- basso livello di espressione
- assenza di una funzione definita

Nonostante l'HLA-G mostri proprietà strutturali delle molecole MHC di classe I, esso possiede peculiari caratteristiche proprie. Innanzitutto la regione corrispondente al promoter dell'HLA-G è unica fra tutti i promoter delle altre molecole MHC di classe I. In secondo luogo, la coda intracitoplasmatica è molto più corta rispetto alle altre molecole di classe I, e proprio a causa di questa coda, estremamente corta, l'endocitosi spontanea dell'HLA-G è estremamente ridotta.

Dal paragone con le proprietà delle altre molecole di classe I, attraverso recenti studi si è cercato di trovare una risposta ai seguenti quesiti:

- 1. Come è ristretta la distribuzione tissutale dell'HLA-G?*
- 2. L'HLA-G è in grado di presentare peptidi, e indurre la presentazione dell'antigene?*
- 3. L'HLA-G è un ligando delle cellule NK?*
- 4. Il ristretto polimorfismo dell'HLA-G ha un significato funzionale?*
- 5. Sono presenti HLA-G omologhi in altre mammiferi?*

1. La distribuzione tissutale dell'HLA-G non è ristretta, come si pensava inizialmente

Fino a poco tempo fa, si riteneva che l'espressione di HLA-G, fosse limitata solo alle cellule placentari, ed in particolare, fra le cellule placentari, alle cellule del **citotrofoblastro**. Recentemente, invece, è stata confermata l'espressione del gene in cellule diverse da quelle placentari, come ad esempio a livello delle cellule timiche.

Attraverso tecniche quali l'ibridizzazione *in situ*, o l'analisi tramite Northern Blot si è potuta studiare l'espressione dei messaggeri dell'HLA-G entro il primo trimestre della gravidanza; una più precisa localizzazione delle proteine dell'HLA-G nelle cellule placentari è stata recentemente resa possibile dall'uso di specifici anticorpi monoclonali contro l'HLA-G. Tutti questi studi hanno dimostrato che tutte le popolazioni delle cellule citotrofoblastiche esprimono, *in vivo*, l'HLA-G. Recentemente, è stato messo in evidenza che HLA-G è anche espresso dalle cellule endoteliali dei vasi fetali, presenti nei villi corionici. Al contrario, nessun anticorpo monoclonale anti-HLA-G è risultato positivo nelle cellule endoteliali delle arterie spirali materne, o nel cordone ombelicale.

In aggiunta alle cellule placentari, mRNA di HLA-G sono stati osservati in molti tessuti umani dell'adulto: linfociti B o T del sangue periferico, cheratinociti, occhio adulto e fetale, timo e fegato fetale, e cellule germinali maschili.

Studi ancora più recenti, eseguiti con anticorpi monoclonali 87G, hanno mostrato che l'espressione dell'HLA-G sulla superficie cellulare può essere indotta dall'INF- γ sui macrofagi e sui monociti del sangue.

2. HLA-G ha la capacità di legare peptidi e di presentare l'antigene

HLA-G lega preferenzialmente peptidi nonameri, i cui motivi seguono principalmente i motivi dell'MHC di classe I, ma con caratteristiche proprie:

- Residuo in posizione 2: Leucina
- Residuo in posizione 3: Prolina
- Residuo in posizione 9: Leucina
- Residuo in posizione 7: Leucina o Valina
- Residuo in posizione 1: Lisina o Arginina
- Residuo in posizione 6: Tirosina
- Residuo in posizione 8: Glutammato o Metionina

Quali sono le conseguenze funzionali dei peptidi di legame dell'HLA-G? Innanzitutto, i peptidi legati alle proteine dell'HLA-G nelle cellule epiteliali timiche possono indurre una selezione negativa o positiva sulle cellule T immature, a seconda del livello di espressione dell'HLA-G.

Può l'HLA-G partecipare alla risposta del sistema immunitario nell'eliminazione di cellule tumorali o di cellule infette? HLA-G ha probabilmente la capacità di sostituire peptidi self presenti accidentalmente nella tasca legante il peptide con peptidi estranei. Inoltre HLA-G è forse in grado di legare peptidi derivati da virus che hanno infettato l'utero materno durante la gravidanza, e prevenire così che l'infezione si diffonda al feto.

3. HLA-G è un ligando delle cellule NK

L'ipotesi che HLA-G possa avere un ruolo nell'impedire che il trofoblasto possa essere attaccato dagli NK materni presenti nella decidua è stata proposta da numerosi autori. Il primo passo è stato quello di dimostrare che HLA-G è un ligando di qualche recettore di cellule NK, e successivamente di identificare la natura e la funzione di tali recettori.

Il primo recettore legante HLA-G riconosciuto è **LIR-1/ITL-2**, che funziona come recettore inibente le cellule NK, ed è espresso in tutti i tipi di cellule coinvolti nella risposta immune, ovvero linfociti B, linfociti T, monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Un altro recettore è il **lectin-like CD94/NKG2A**, recettore eterodimerico che inibisce la lisi cellulare operata dalle cellule NK.

Infine, rimane da dimostrare che anche un'altra classe di molecole HLA, HLA-E, sia stabilmente espresso *in vivo* sulle cellule che esprimono HLA-G.

4. Il limitato polimorfismo dell'HLA-G ha un significato funzionale

Il limitato polimorfismo dell'HLA-G dovrebbe evitare un'eventuale reazione materna alloimmune, che sarebbe ovviamente letale per il feto. Rimane ancora da dimostrare che l'essere omozigoti per gli alleli di HLA-G possa risultare svantaggioso ai fini della gravidanza e/o nella difesa contro particolari patogeni.

5. Omologhi di HLA-G identificati in altri mammiferi

Un approccio comune utilizzato per attestare la funzione di un gene, è quello di trovare geni omologhi che svolgano funzioni affini in altre specie. Molti geni che mostrano caratteristiche affini ad HLA-G sono stati trovati in altri mammiferi. Innanzitutto, **Qa-2**, espresso in trofoblasti di topo; un altro è **Mamu-G**, il cui locus genico codifica per glicoproteine con tutte le caratteristiche di HLA-G:

1. Ha un dominio citoplasmatico troncato che codifica per un codone di stop all'esone 6.
2. E' espresso innanzitutto a livello placentare, e successivamente nel sinciziotrofoblasto.
3. Ha conservato sia il residuo 77, che il residuo 80, importanti per il riconoscimento delle cellule NK.

CONCLUSIONI

Le domande alle quali si intende porre una risposta sono in ultima analisi tre:

1. Le funzioni dell'HLA-G sono classiche e/o nuove?

Le funzioni dell'HLA-G connesse alla presentazione dell'antigene, o al legame del recettore delle cellule NK, che possono essere considerate come “nuove”, sono:

- a. HLA-G svolge un ruolo importante nel controllo dell'espressione dell'HLA-E
- b. Essendo presente nelle cellule endoteliali dei capillari fetali nella placenta umana, si suppone che HLA-G svolga un ruolo importante nella angiogenesi durante la gestazione.
- c. Lo splicing alternativo del trascritto primario dell'HLA-G può essere un meccanismo utile a produrre nuove forme di HLA-G.

2. HLA-G è essenziale per la sopravvivenza fetale?

HLA-G svolge pienamente una doppia funzione:

- a. Impedisce l'attacco alloimmune delle cellule NK materne contro il feto.
- b. Previene infezioni di patogeni a carico dell'utero.

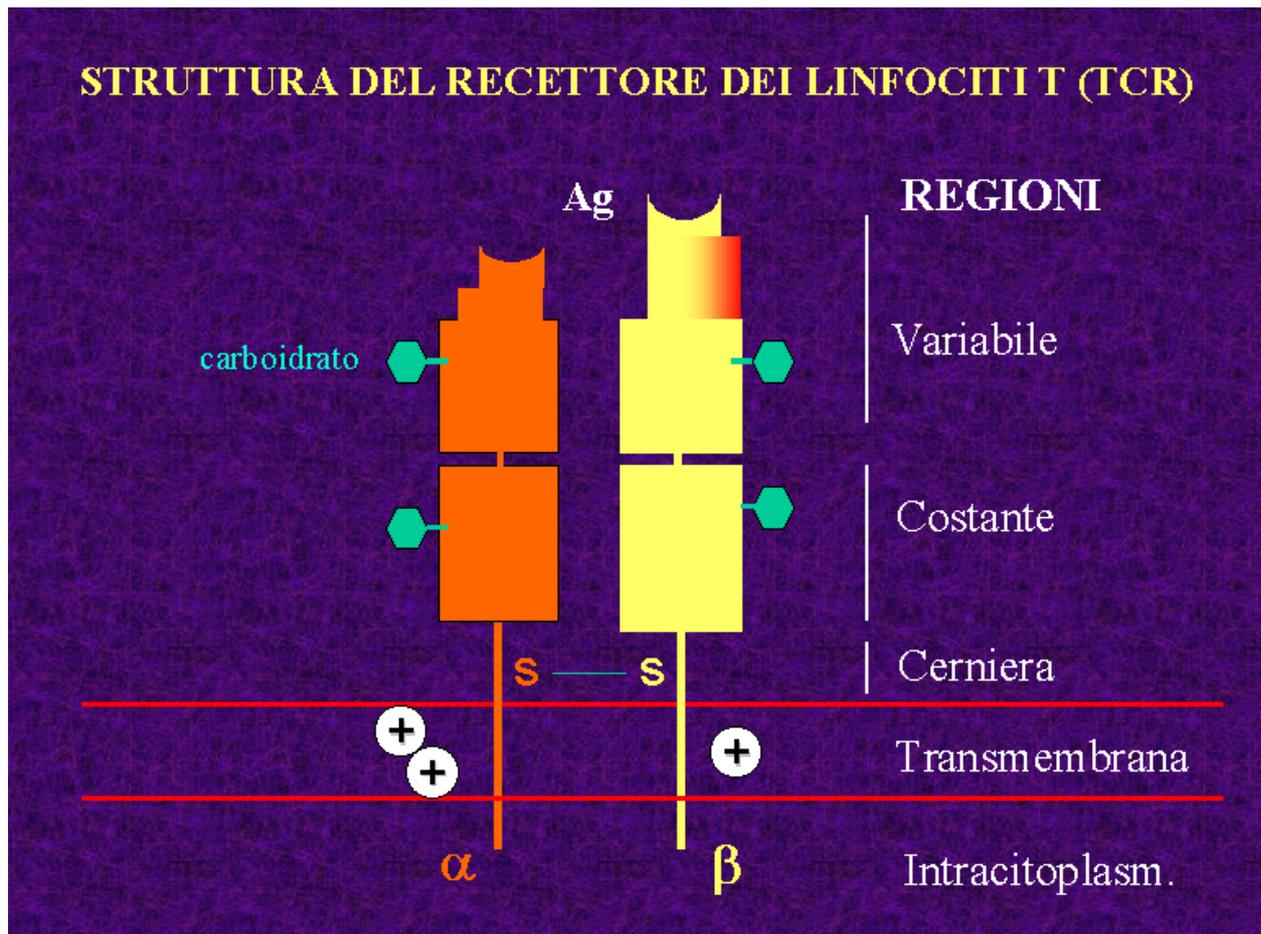
In ogni caso, non c'è una prova definitiva che l'HLA-G giochi un ruolo essenziale nella sopravvivenza del feto.

3. L'HLA-G gioca un ruolo fondamentale nella vita adulta?

Innanzitutto, l'HLA-G è espresso in alcune sottopopolazioni di cellule timiche, e ciò può suggerire che tali molecole di classe I siano coinvolte in qualche processo selettivo. In secondo luogo, l'induzione di HLA-G in macrofagi e monociti, da citochine pro-infiammatorie, si addice con l'ipotesi che l'HLA-G possa essere indotto durante le patologie associate ad infiammazione .

Infine, HLA-G è stato osservato anche in cellule tumorali, e si pensa che possa avere un ruolo protettivo verso l'attacco di cellule NK o CTL.

IL RECETTORE DEI LINFOCITI T



Il *recettore dei linfociti T* (immagine) ha una struttura che ricorda molto da vicino il frammento Fab delle immunoglobuline: in entrambi i casi, infatti, si riconoscono due catene polipeptidiche associate tra loro, ognuna costituita da una porzione variabile e da una costante, e in entrambi i casi il sito di legame per l'antigene è dato dall'unione dei due domini a livello della regione variabile. La notevole somiglianza tra le due strutture deriva dal fatto che i geni codificanti per esse hanno un'origine comune e si sono evoluti insieme: sia il TCR che le immunoglobuline fanno parte di un'unica grande famiglia di molecole chiamata "**superfamiglia delle immunoglobuline**". Il TCR è **MONO-VALENTE**, nel senso che lega solamente 1 antigene, e non 2 come le immunoglobuline (che infatti sono dette "bivalenti" perché hanno 2 braccia). Inoltre, a differenza delle Ig, il TCR non è mai secreto, ma rimane attaccato alla membrana del suo linfocita. A riposo, ogni linfocita T espone sulla sua superficie circa 30.000 molecole di TCR.

STRUTTURA

Il TCR è una glicoproteina eterodimerica costituita, nella maggior parte dei linfociti circolanti, da due diverse catene chiamate α e β ; tale recettore presenta tre domini:

- un dominio extracellulare formato dalle due catene e in particolare dalle due regioni, **costante** e **variabile**, di esse, e dalla cosiddetta **regione cerniera** dove è presente il ponte disolfuro tra residui di cisteina;
- un dominio transmembrana dove sono presenti aminoacidi carichi positivamente che interagiscono con altre molecole di membrana;
- un dominio intracellulare formato dalle due code code delle catene α e β , rispettivamente di 9 e 12 aminoacidi.
- Vi è inoltre una coda intra-citoplasmatica, a cui sono legate varie molecole importanti nella trasduzione del segnale.

Vi è poi un altro tipo di TCR formato da 2 diverse catene polipeptidiche dette γ e δ , ma questa forma di recettore è presente in una minoranza dei linfociti circolanti (intorno al 5% di tutti i linfociti T) e lo riprenderemo più tardi.

La Regione Variabile, V, della catena α è formata dalla ricombinazione di 2 segmenti genici separati: V e J (come la catena leggera delle Ig).

La Regione V della catena β è invece formata dall'unione di 3 segmenti genici: V, D e J (come la catena pesante delle Ig).

A livello del sito di riconoscimento e legame per l'antigene, come nel caso delle immunoglobuline, sono presenti delle regioni **ipervariabili**, ossia regioni in cui è concentrata la maggiore variabilità della catena aminoacidica. Tali regioni, dette **CDR (Complementary Determining Regions, ovvero regioni determinanti complementari)**, sono tre ed hanno una particolare disposizione che rispecchia in tutto e per tutto la loro funzione: le regioni CDR1 e CDR2 (una per ciascuna catena del TCR) hanno una localizzazione più periferica rispetto alle due regioni CDR3, che si trovano quindi al centro della tasca di legame. In questo modo, **le regioni CDR3 prendono contatto direttamente con il peptide antigenico presentato al TCR dalle molecole MHC**, mentre **le regioni CDR1 e CDR2 prendono contatto con le molecole MHC stesse**. Le due regioni CDR3 sono infatti quelle dove la variabilità aminoacidica è maggiore ed è per questo che prendono contatto con una struttura estremamente variabile come il peptide; le regioni CDR1 e CDR2 hanno una variabilità nettamente minore ed è quindi logico che prendano contatto con le molecole MHC che sono molto meno variabili del peptide antigenico.

MOLECOLE ASSOCIATE AL TCR

- Le code intracitoplasmatiche del TCR hanno la caratteristica di essere troppo piccole per riuscire a trasdurre il segnale, proveniente dal contatto tra recettore ed antigene, ovvero l'informazione che arriva dalla membrana cellulare e va al nucleo. Questa funzione viene allora svolta da un complesso proteico di membrana chiamato **CD3**. Tale complesso è costituito da tre proteine, omologhe tra loro e alle immunoglobuline, dette γ , δ ed ϵ ; queste catene si associano tra loro a formare gli eterodimeri $\gamma\epsilon$ e $\delta\epsilon$ i quali interagiscono con il TCR a livello dei domini transmembrana grazie agli aminoacidi carichi negativamente che qui sono presenti. Il complesso CD3 è costituito anche da altre due catene chiamate ζ e η le quali si associano tra loro a formare l'omodimero $\zeta-\zeta$ (nell'80% dei casi) o l'eterodimero $\zeta-\eta$ (nel restante 20% dei casi). Tale dimero è interamente contenuto a livello intracitoplasmatico ed ha un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale. Non è noto se le due diverse catene conferiscano alla cellula diverse proprietà funzionali; si sa però che le due proteine derivano dallo stesso trascritto primario mediante un meccanismo di splicing alternativo e che presentano lievi differenze a livello dell'estremità C-terminale. L'associazione del CD3 al TCR è necessaria per il trasporto del recettore in membrana: questo processo ha inizio nel reticolo endoplasmatico dove, in un primo momento, al complesso $\alpha\beta$ si lega una catena detta ω .

Qui cominciano anche ad assemblarsi i dimeri $\gamma\epsilon$ e $\delta\epsilon$ che poi verranno trasportati nel Golgi insieme alle altre catene; nel Golgi le catene γ , δ ed ϵ si legano al complesso $\alpha\beta$ scalzando così la catena ω che viene degradata, dopodiché al complesso $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ si lega anche il dimero $\zeta-\zeta$ o $\zeta-\eta$. Quest'ultimo evento è necessario per il trasporto del TCR in membrana dal momento che i complessi $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ che non legano tali dimeri vengono degradati.

- La molecola **CD4** è presente sui linfociti T con prevalente funzione helper. Tale molecola è un monomero contenente 4 domini con elevata omologia con quelli delle immunoglobuline. La porzione extracellulare del CD4 è formata da una struttura rigida, costituita dai domini D1 e D2, collegata da una giunzione flessibile agli altri 2 domini della molecola detti D3 e D4. Nella struttura del CD4 si riconoscono inoltre un dominio transmembrana e uno intracellulare. Mediante i domini D1 e D2 il CD4 lega un sito del dominio $\beta 2$ della molecola MHC II posto molto lontano dal sito di legame fra la stessa molecola MHC e il TCR: per questo motivo il CD4 e il TCR possono legare contemporaneamente il complesso molecolare MHC II-peptide. Inoltre, il TCR ed il CD4 vengono a contatto soltanto durante il riconoscimento dell'antigene ed hanno un effetto sinergico nell'induzione del segnale. La presenza del CD4 determina una diminuzione pari a 100 volte della dose di antigene necessario per indurre l'attivazione.

- La molecola **CD8** è presente sui linfociti T con prevalente funzione citotossica. Tale molecola è un eterodimero formato da una catena α ed una catena β legate da un ponte disolfuro. Le due catene hanno una struttura simile, avendo ciascuna un singolo dominio omologo alla porzione V delle Ig e un lungo peptide con conformazione distesa che lega il primo dominio alla membrana. Il CD8 lega, mediante il dominio α , il dominio $\alpha 3$ della molecola MHC I. Anche il CD8 aumenta di circa 100 volte la sensibilità della cellula all'antigene.

Nonostante la struttura di queste due molecole sia molto diversa, entrambe svolgono **la funzione di CO-RETTORI** e mediano il cosiddetto **SECONDO SEGNALE**, ossia il segnale co-stimolatorio aspecifico. Il segnale **NUMERO 1** è invece specifico in quanto è dato dal legame dell'antigene al recettore.

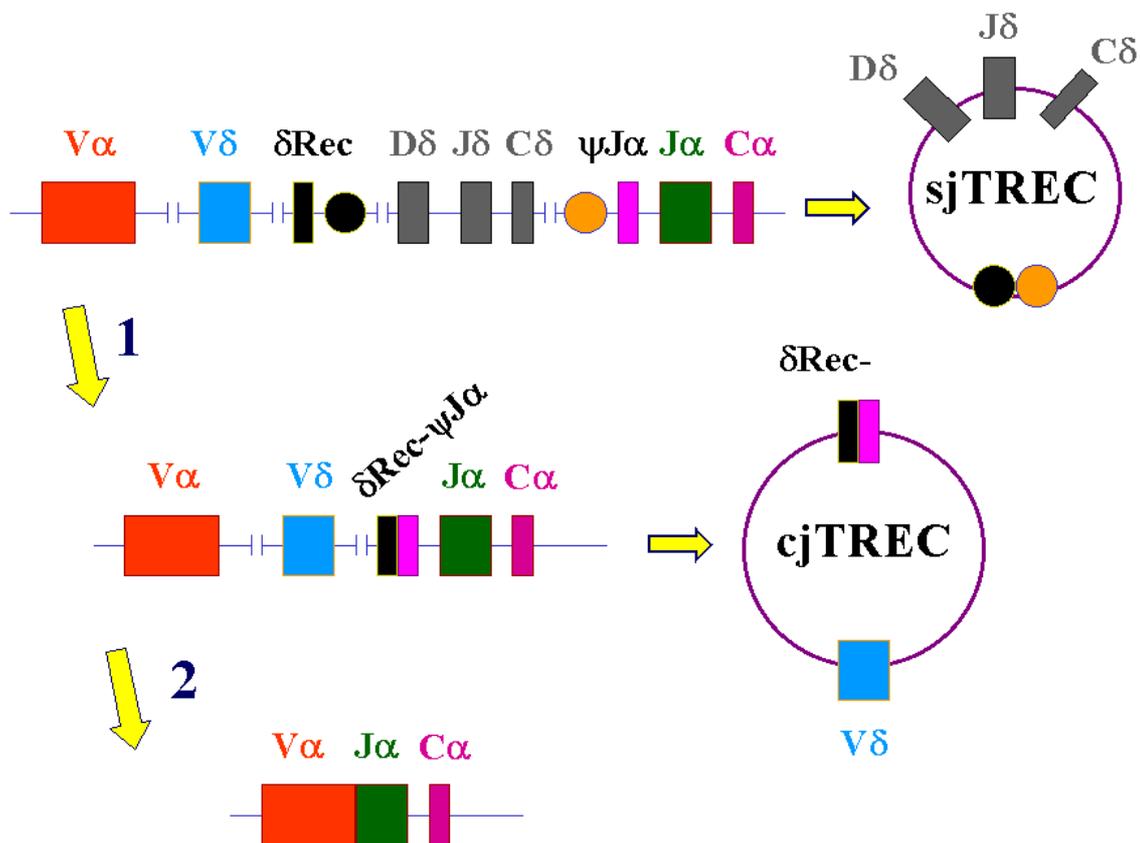
Tutte queste molecole intervengono nella trasduzione del segnale dalla membrana cellulare al nucleo. In seguito al legame dell'antigene al TCR, si ha l'aggregazione del recettore con il co-recettore (CD4 o CD8); questo causa l'aggregazione delle chinasi citoplasmatiche. In particolare, **le tirosin chinasi fyn e lck** si legano rispettivamente alla catena ζ del CD3 e al dominio intracellulare del co-recettore; in seguito, fyn fosforila una tirosina sulla catena ζ e questo permette il legame e l'attivazione di **ZAP-70** (proteina associata alla catena ζ con un p.m. di 70 KDa). L'attività di questi enzimi è modulata da un'altra molecola di superficie detta **CD45 o LCA (Antigene Comune dei Leucociti** - poiché è presente su tutti i globuli bianchi). La porzione intacitoplasmatica di tale molecola ha un'attività fosfatase per la tirosina e attiva fyn ed lck. Le chinasi ZAP-70 e fyn attivano la fosfolipasi C- γ che idrolizza il fosfatidil inositolo a diacilglicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP3): il DAG attiva la protein chinasi C (PKC), IP3 aumenta la concentrazione intracellulare del Ca^{2+} rilasciandolo dal reticolo endoplasmico e favorendone l'entrata dai fluidi extracellulari. La PKC ed il calcio determinano l'attivazione delle proteine che legano il DNA, tra le quali l'**NF- κ B**. Tali proteine inducono la trascrizione di geni codificanti per proteine, come l'**interleuchina 2**, che inducono la proliferazione e la differenziazione della cellula T.

I GENI DEL TCR

Il locus genico della catena α è localizzato sul cromosoma 14; esso è costituito da segmenti **V** (100 nel topo, 70-80 nell'uomo), segmenti **J** (50 nel topo, 61 nell'uomo), e un segmento **C**. Il locus genico della catena β è localizzato sul cromosoma 7 ed è costituito da segmenti **V** (30 nel topo, 75-80 nell'uomo), due gruppi di segmenti **J** (6 segmenti per gruppo sia nell'uomo che nel topo), due gruppi di segmenti **D** (2 nel topo e 3 nell'uomo) e due segmenti **C** (sia nel topo che nell'uomo).

Come già detto, circa il 95% dei linfociti totali ha un recettore di tipo $\alpha\beta$, il restante 5% ha un recettore di tipo $\gamma\delta$. Il locus genico della catena δ è localizzato sul cromosoma 14 tra i segmenti **V** e i segmenti **J** della catena α , ed è costituito da segmenti **D** (2 nel topo, 7 nell'uomo), **J** (2 nel topo, 3 nell'uomo) ed 1 segmento **C** (sia nel topo che nell'uomo). I segmenti **V** per la cat. δ si trovano in mezzo ai segmenti **V** della cat. α .

A causa della sua localizzazione tra i geni per la cat. α , ogni riarrangiamento dei segmenti genici della cat. α induce una delezione dei geni δ , che vengono rimossi in due tappe durante il processo di ricombinazione di $V\alpha$ con $J\alpha$. L'eliminazione dei geni per la catena δ però non ne comporta la scomparsa, dal momento che il DNA per i geni δ permane nel nucleo in forma circolare, e dà origine ai cosiddetti **TREC (T cell receptor Rearrangement Excision Circles)**, che non si possono però replicare. Di conseguenza, quando una cellula si divide, i TREC vengono passati soltanto ad una delle due figlie; con il ripetersi delle divisioni i TREC vengono poi diluiti nella popolazione linfocitaria. La quantificazione dei linfociti T che possiedono i TREC è pertanto **un marcatore** di due fenomeni. Il primo riguarda la maturazione cellulare intratimica e l'efficienza della selezione positiva, dato che le cellule che iniziano a riarrangiare la catena α producono un primo TREC, il **signal-joint (sj)-TREC**, quindi si replicano 3-4 volte (grazie al processo di selezione positiva), infine concludono il riarrangiamento di $V\alpha$ su $J\alpha$ e producono il secondo TREC, il **coding-joint (cj)-TREC** (vedi Figura sottostante). Il secondo fenomeno riguarda l'uscita dal timo di cellule neoformate, dal momento che le cellule che possiedono i TREC (con cj-TREC presente 3-4 volte più di sj-TREC) sono i "recenti emigranti dal timo" (*recent thymic emigrants, RTE*) (Verschuren, J. Immunol.158:1208-1216, 1997; Douek, Nature 396: 690-695, 1998; Jamieson, Immunity 10: 569-575, 1999), e danno una diretta e precisa indicazione della funzionalità dell'organo.



Il locus genico della catena γ è invece localizzato sul cromosoma 7 e possiede i segmenti V, J e C. Il motivo per cui un linfocita T “decida” di riarrangiare un TCR $\alpha:\beta$ o $\gamma:\delta$ non è ancora ben chiaro:

- entrambi derivano da un progenitore comune,
- i TCR $\delta:\gamma$ sembrano svilupparsi anche in assenza di un timo funzionale, es. nei “nude mice”,
- i TCR $\delta:\gamma$ non hanno CO-RETTORI (CD4 e CD8), perciò sembra che riconoscano antigeni NON presentati dalle molecole MHC, ma piuttosto associati a carboidrati, cere o lipidi.
- i TCR $\delta:\gamma$ sono espressi prevalentemente nelle prime fasi di sviluppo embrionale (la gran parte dei linfociti periferici possiedono infatti tale recettore) per poi diminuire fino al 5%.
- sono presenti ad “ondate” in diversi distretti corporei, a seconda del segmento V della cat. δ che esprimono:

dopo circa due settimane di gestazione, il locus $C\gamma 1$ viene espresso insieme al gene V più vicino ($V\gamma 5$) e i linfociti che ne risultano migrano prevalentemente a livello dell’epidermide. Dopo alcuni giorni, le cellule che esprimono $V\gamma 5$ diminuiscono e vengono sostituite da cellule che esprimono il segmento successivo, cioè $V\gamma 6$. Tali cellule migrano prevalentemente verso l’epitelio del tratto riproduttivo. Entrambe queste catene γ riarrangiate vengono espresse con la stessa catena δ e quindi le cellule delle ondate precoci hanno la stessa specificità e sono poco eterogenee. Dopo la nascita, diviene prevalente la popolazione dei linfociti $\alpha\beta$ che migra verso i tessuti linfoidi; una piccola percentuale di cellule $\gamma\delta$ continua però ad essere prodotta, ma queste cellule sono molto più eterogenee di quelle precedenti dato che derivano dal riarrangiamento di molti più segmenti V (in particolare $V\gamma 1,2,4,7$). Inoltre, questi linfociti migrano verso i tessuti linfoidi e non verso l’epitelio come quelli delle prime ondate.

Se si confrontano il numero dei segmenti genici e le fonti di diversità fra i recettori $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, si può vedere che la variabilità totale dei recettori è in entrambi i casi di 10^{16} , ma nei linfociti $\alpha\beta$ è data sia dal numero elevato di geni V (100 per la catena α e 30 per la catena β) che dalla variabilità di giunzione, mentre nei linfociti $\gamma\delta$ è data quasi esclusivamente dalla variabilità di giunzione stessa dato che i geni V sono molti di meno (6 per la catena γ e 7 per la δ).

La ricombinazione avviene nel timo, e segue praticamente gli stessi meccanismi che si hanno per le immunoglobuline:

- ci sono sempre le sequenze conservate EPTAMERICHE e NONAMERICHE,
- ci sono gli stessi enzimi per la ricombinazione,
- ci sono i nucleotidi-P ed -N (questi ultimi presenti sia nella cat. α che β , mentre solo nella cat. pesante delle Ig perché l’enzima TdT responsabile dell’aggiunta dei nucleotidi-N si “spegne” al termine del riarrangiamento delle cat. pesanti, e non è perciò disponibile per le cat. leggere).

Il riarrangiamento dei geni del TCR ha inizio sul locus genico codificante per la catena β . Inizialmente un segmento $D\beta$ riarrangia con uno dei segmenti $J\beta$ in maniera del tutto casuale, e si forma un unico segmento genico $(DJ)\beta$ con eliminazione del DNA interposto. Successivamente, $(DJ)\beta$ riarrangia con uno dei segmenti $V\beta$ e si forma così il locus $(VDJ)\beta$ che codificherà per la regione variabile della catena β . A questo punto tale locus riarrangia con il segmento $C\beta 1$ e, se tale riarrangiamento risulta produttivo, la catena β viene sintetizzata ed è presente a livello del citoplasma. L’espressione della catena β in membrana, in associazione con un surrogato della catena α , detto μ : α determina una serie di eventi:

- espressione in membrana delle molecole CD4 e CD8;
- blocco del riarrangiamento ulteriore dei geni della catena β ;
- proliferazione della cellula.

All'interno della cellula vi sono due geni, detti *RAG-1* e *RAG-2*, che **mediano la ricombinazione** del recettore; le proteine da essi derivate, in particolare *RAG-2*, vengono degradate quando la cellula è in proliferazione. Di conseguenza, fintanto che il linfocita prolifera non può avvenire il riarrangiamento dei geni della catena α . Questo fa sì che ogni riarrangiamento riuscito di un gene della catena β dia origine a molti linfociti doppiamente positivi ognuno dei quali ricombina indipendentemente i geni della propria catena α una volta che la cellula ha smesso di dividersi. In questo modo nella progenie risultante una singola catena β è associata con molte catene α diverse. Il riarrangiamento dei geni della catena α avviene come per la catena β , con la differenza che in questo caso mancano i segmenti D: accade allora che un segmento $V\alpha$ riarrangia con uno $J\alpha$, dopodiché $(VJ)\alpha$ riarrangia a sua volta con $C\alpha$. Come già detto, siccome il locus genico codificante per la catena δ è contenuto nel locus della catena α , il riarrangiamento dei geni α elimina automaticamente la possibilità del riarrangiamento dei geni δ . Una volta che la catena α è stata prodotta, viene espressa in membrana in associazione con la catena β e a questo punto il linfocita T doppiamente positivo è pronto per essere sottoposto alla selezione timica.

Come accade per le Ig, anche nel caso del TCR possono avvenire dei riarrangiamenti non produttivi, ossia che danno origine a catene α e β non funzionali. La cellula utilizza allora dei meccanismi di salvataggio che consentono di recuperare catene che altrimenti andrebbero perdute. Per quanto riguarda la catena β , riarrangiamenti successivi possono salvare cellule con un riarrangiamento non funzionale solo se questo coinvolge il locus $C\beta 1$. Infatti, è possibile un successivo riarrangiamento in cui un secondo segmento genico $V\beta$ ricombina con un segmento DJ nel locus $C\beta 2$, eliminando il locus $C\beta 1$ ed il gene riarrangiato in maniera non produttiva. Per quanto riguarda la catena α , la molteplicità dei segmenti genici V e J permette riarrangiamenti successivi che consentono di saltare segmenti genici VJ riarrangiati in maniera non produttiva, eliminando il tratto di DNA corrispondente. Questo processo può continuare anche dopo che la cat. α è stata espressa in superficie, per i tre o quattro giorni successivi, finché non avviene un riarrangiamento efficace o finché non si sono esauriti tutti i segmenti V o J disponibili. Le modalità di salvataggio della catena α assomigliano a quelle attuate per la catena κ delle Ig.

Quali sono, dunque, i principali meccanismi che generano la diversità del TCR?

- Il numero elevato di segmenti V, D e J della linea germinale;
- L'associazione combinatoria dei diversi segmenti durante il riarrangiamento che avviene in modo del tutto casuale;
- La diversità giunzionale, che coinvolge sequenze codificanti in corrispondenza delle giunzioni VJ, VD, DJ, e che è data dall'aggiunta casuale di nucleotidi e dalla imprecisione nella giunzione dei segmenti genici;
- L'appaiamento delle catene α e β che serve a moltiplicare la diversità generata in ogni singola catena.

A differenza di quanto accade per le immunoglobuline, la diversità nei recettori della cellula T non è aumentata da meccanismi di ipermutazione somatica, ossia dalla comparsa di mutazioni casuali dopo che è già avvenuto il riarrangiamento dei geni. Le spiegazioni possibili di questo fenomeno potrebbero essere le seguenti:

- evitare che l'eccessiva variabilità del recettore causata dall'ipermutazione possa favorire l'emergere di cloni di linfociti T mutanti verso gli autoantigeni durante la risposta immunitaria;
- evitare la perdita del riconoscimento delle molecole MHC da parte del linfocita T e quindi la non responsività immunitaria.

Probabilmente l'ipotesi più plausibile è anche quella più semplice, ossia che l'ipermutazione somatica sia un meccanismo acquisito ed esclusivo delle cellule B poiché devono secernere anticorpi con alta affinità onde captare le tossine presenti nei fluidi extracellulari.

MATURAZIONE DEI LINFOCITI T

INTRODUZIONE:

Un linfocita T deve possedere due caratteristiche fondamentali:

1. Restrizione per l'MHC autologo
2. Tolleranza per il self

Per raggiungere questi due obiettivi, i linfociti T vengono sottoposti a due processi:

1. Selezione Positiva (per la restrizione MHC)
2. Selezione Negativa (per la tolleranza verso il self)

La maturazione dei linfociti T è un evento coordinato al riarrangiamento dei geni del TCR.

La cellula staminale può avere tre destini:

- 1) mantenersi come tale;
- 2) originare progenitori mieloidi;
- 3) originare progenitori linfoidi (linfociti B o T).

Nel timo i linfociti T hanno due possibili destini: diventare $\gamma\delta$, ed in questo caso non andare incontro a selezione, oppure $\alpha\beta$ e subire selezione positiva e negativa.

I linfociti T subiscono due tipi di fenomeni differenziativi e maturativi:

1) **differenziamento e maturazione INTRATIMICA** durante la quale il progenitore linfoide entra nel timo a livello corticale, matura fino ad uscire per andare in periferia, a colonizzare gli organi linfoidi secondari;

2) **maturazione EXTRATIMICA** data dall'incontro del linfocita T con l'antigene, maturazione tale da dare una risposta più efficace al secondo incontro con lo stesso Ag.

Vi è probabilmente anche un'altra via di maturazione extra-timica che parte dal midollo osseo e va direttamente agli organi linfoidi periferici senza passare per il timo, per consentire una adeguata produzione di linfo T anche quando il timo involge (circa a 50 anni).

DIFFERENZIAZIONE INTRATIMICA:

è caratterizzata da fenomeni di proliferazione cellulare con la conseguente formazione di cloni, che vanno incontro ai primi processi di selezione; vengono espressi in modo coordinato marcatori fenotipici e funzionali che ci permettono di riconoscere la cellula e lo stadio in cui si trova. Si ottengono così linfociti T che, in periferia, sono in grado di riconoscere il “self” dal “non self”.

I protagonisti di tali processi a livello del microambiente timico sono vari:

- TCR
- CD3
- CD4/CD8
- MHC 1 e MHC 2
- Ag self e non self
- altri recettori (es: CD25, CD44) e marcatori di attivazione

Il timo del topo presenta $100-200 \times 10^6$ cellule: ogni giorno ne muoiono 50×10^6 e solo 1×10^6 esce dal timo (il 95-98% muore per apoptosi, il resto pari a circa il 2% esce e va in periferia).

Negli anni '50 **Gross** fece degli studi sui tumori: prendeva tessuti leucemici di topi con alta incidenza di leucemia e, dopo averli filtrati, li metteva in topi con bassa incidenza di leucemia. Se il topo ricevente era un neonato si otteneva il tumore, mentre se era adulto no. In seguito ad autopsia individuò che il timo del neonato era coinvolto nel processo leucemico, a differenza di quello dell'adulto (scarsamente rappresentato in quanto con l'età il timo va incontro ad involuzione), che rimaneva non toccato.

Successivamente **J. Miller** si chiese se il virus di Gross si potesse replicare solo nel timo neonatale. Per rispondere a tale domanda, prese un topo neonato e dopo averlo timectomizzato gli iniettò il virus di Gross; al topo non comparì la leucemia ma altre situazioni patologiche quali cachessia, infezioni di diverso tipo, e l'animale era caratterizzato da atrofia linfonodale, e dalla presenza di pochi linfociti circolanti (che erano soprattutto linfociti B). In altre parole, l'animale presentava **un severo stato di immunodeficienza**. Miller si chiese quindi se nel timo ci fossero i progenitori delle cellule immunocompetenti. Prese un ratto e trapiantò la sua cute in un topo neonato ed in un topo adulto, entrambi timectomizzati: nel neonato si ottenne l'attecchimento del trapianto, nell'adulto il rigetto. La conclusione fu che durante l'embriogenesi **il timo produce i progenitori delle cellule immunocompetenti**. All'epoca si era a conoscenza solo del fatto che le cellule implicate non erano precursori delle cellule che producono anticorpi (ovvero non erano linfociti B), e questo si è poi rivelato essere vero.

IL TIMO

Il timo è un organo impari costituito da due lobi localizzato nel mediastino anteriore in posizione retrosternale. Il timo si forma precocemente dall'endoderma e dall'ectoderma di due strutture embrionali note come 3 tasca faringea e 3 fessura branchiale. La struttura così originata è detta abbozzo timico e presenta una regione corticale di derivazione ectodermica e una regione midollare di derivazione endodermica. Ciascuno dei due lobi del timo si suddivide in più lobuli nei quali, a loro volta, si distingue una porzione subcapsulare, una corticale ed una midollare (queste ultime due unite da una giunzione cortico-midollare). Nell'uomo sono a disposizione pochi dati relativi all'embriogenesi del timo, poiché essa avviene entro il 3 o 4 mese di vita intrauterina. Il processo maturativo dei linfociti T dipende dall'interazione dei linfo T immaturi con le cellule epiteliali stromali del timo. Il ruolo dei diversi epiteli timici è stato evidenziato in seguito ad esperimenti condotti su diversi topi:

- il **topo SCID** (cioè con immunodeficienza combinata severa) presenta mutazioni dei geni RAG1 e RAG2 coinvolti nella ricombinazione dei recettori dei linfociti T e delle Ig, perciò sia i linfociti B che T non maturano. Hanno però il timo, quindi la componente epiteliale di questi è normale;
- il **topo "nude"** (nudo) è senza pelo: questo è una conseguenza di mutazioni in seguito alle quali risultano alterati i foglietti ectodermici e manca il timo quindi è privo di linfociti T; (ma hanno il midollo osseo funzionante, quindi la componente linfocitaria è normale).

Trapiantando il midollo osseo del topo nudo in quello SCID, quest'ultimo diventa normale quindi si può affermare che trapiantando progenitori linfoidi da un topo privo di timo ad uno con il timo questi maturano. Viceversa se trapiantiamo il timo del topo "scid" in quello "nudo" questo pur rimanendo privo di pelo diviene immunocompetente. Tutto ciò sta a dimostrare l'importanza in un soggetto, della componente epiteliale e di quella linfocitaria, per essere immunocompetenti.

Il ruolo della componente epiteliale può anche essere dimostrato togliendo il timo ad un topo nudo con MHC^{AxB} , e sostituendolo con un timo MHC^A : in seguito a questo maturano tutti i linfociti con background MHC^{AxB} , ma verranno riconosciuti solo gli antigeni presentati da MHC^A (in questo caso la componente linfocitaria è AxB mentre quella epiteliale è A); si può quindi dire che durante la maturazione i linfociti vengono istruiti a riconoscere MHC^A dalla componente epiteliale A . Ciò dimostra che "ciò che le cellule T mature considerano come MHC autologo, è determinato dalle molecole MHC espresse dalle cellule dello stroma timico che esse incontrano durante lo sviluppo intra-timico." Quindi il microambiente in cui la cellula T matura, determina il tipo di Restrizione MHC del repertorio recettoriale TCR che si formerà. Le cellule epiteliali corticali del timo sono dunque le cellule critiche che governano la specificità della Selezione Positiva.

Il microambiente timico è di diversa derivazione: nella corticale ci sono cellule di derivazione ectodermica, mentre nella midollare di derivazione endodermica. Nella corticale sono presenti timociti immaturi e macrofagi; nella midollare sono presenti timociti maturi, cellule dendritiche (importanti perchè presentano gli antigeni); sono presenti i corpuscoli di Hassal che rappresentano zone di fagocitosi dei corpi apoptotici (zone di necrosi secondaria ad apoptosi).

Il microambiente timico presenta due funzioni:

- funzione di tipo endocrino: produzione di fattori di crescita in grado di attirare i pre-timociti, trasformarli in timociti, farli proliferare e maturare;
- funzione di tipo selettiva.

I linfociti una volta arrivati a livello subcapsulare vanno in contro a proliferazione; le cellule epiteliali della corticale, dette NURS (nutrici), sono responsabili della proliferazione dei timociti solo a condizione di avere una discreta affinità di interazione con essi. Questa interazione si ha tra la prima catena del recettore dei linfociti T e l' $MHC 2$.

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE CITOCHINE

Le Citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie prodotte da vari tipi di cellule, ed hanno la funzione di condizionare il comportamento di altre cellule-specifiche verso cui sono indirizzate. Si comportano quindi da “mediatori” tra le diverse cellule, ed agiscono da segnali inter-cellulari. Sotto il nome collettivo di **citochine** raggruppiamo molecole che si pensava fossero prodotte esclusivamente da linfociti (**Linfochine**) o da monociti (**Monochine**). Presentano collettivamente le seguenti caratteristiche generali:

- Sono molecole prodotte essenzialmente **durante la fase di attivazione e durante la fase effettrice** sia dell'immunità **naturale** che di quella **specificata**.
- La loro secrezione è in genere **un fenomeno di breve durata ed autolimitato**. In generale, infatti, le citochine sono sempre prodotte *ex-novo* dalla trascrizione dei loro geni, e non vengono mai accumulate nella cellula come molecole preformate.
- Numerose citochine sono prodotte da tipi cellulari diversi, ed agiscono su tipi cellulari diversi (**pleiotropismo**). Inizialmente si pensava che alcune di esse potessero agire soltanto sui leucociti, da cui il nome INTERLEUCINE (cioè molecole prodotte da leucociti per leucociti), ma si è visto che ciò non è vero.
- Possono avere effetti diversi sulla stessa cellula bersaglio, ovvero una citochina può antagonizzare l'effetto dell'altra, dirette entrambe sulla stessa cellula.
- La loro attività è spesso **ridondante**, ovvero citochine diverse possono avere la stessa azione biologica.
- Le citochine influenzano spesso la sintesi di altre citochine e/o la loro attività. Le Citochine possono operare in modo SINERGICO e COOPERATIVO potenziandosi a vicenda.
- Come accade per tutti gli ormoni polipeptidici, anche le citochine per svolgere il loro ruolo, hanno bisogno di legarsi a **recettori specifici** presenti sulle cellule bersaglio. Tali cellule possono essere:
 - le stesse cellule che secernono la citochina (azione **AUTOCRINA**)
 - cellule vicine o a breve distanza (azione **PARACRINA**)
 - cellule lontane (azione **ENDOCRINA**). In questo caso, usano il sangue come mezzo di trasporto.
- L'affinità di un recettore per la propria citochina è estremamente alta, ovvero il legame recettore/citochina può avere una costante di dissociazione dell'ordine di 10^{-10} - 10^{-12} M. Si ricorda che la Kd per il legame antigene-anticorpo è dell'ordine di 10^{-7} - 10^{-11} M, quella del complesso MHC-peptide 10^{-6} M.
- L'espressione di molti recettori per le citochine è regolata da segnali specifici.
- La maggior parte delle risposte cellulari alle citochine non è immediata, ma richiede neosintesi di mRNA e di proteine.
- Le citochine si comportano, per molti tipi cellulari, come fattori di crescita o come regolatori della divisione cellulare. Per altri tipi cellulari possono invece innescare meccanismi che ne mediano la morte. In molti casi la **DOSE** della citochina decide il tipo di effetto biologico.

CLASSIFICAZIONE DELLE CITOCHINE

La classificazione che si propone si basa esclusivamente sulla **FUNZIONE PRINCIPALE** della citochina, ovvero su quella che, attualmente, viene considerato il suo aspetto più caratteristico e di maggiore rilevanza biologica.

1. MEDIATORI E REGOLATORI DELL'IMMUNITA' INNATA

Ovvero quelle che sono anche considerate “Citochine Infiammatorie”, prodotte principalmente da Fagociti Mononucleati per potenziare o inibire le reazioni infiammatorie. Esse sono:

TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, chemochine, IFN- α , IFN- β

2. MEDIATORI E REGOLATORI DELL'IMMUNITA' SPECIFICA

Ovvero le “Citochine Immunitarie”, prodotte soprattutto da linfociti T in risposta ad un riconoscimento antigenico specifico, per stimolare e sfruttare al massimo le risposte infiammatorie. Esse sono:

IL-2, IL-4, TGF- β , IFN- γ , LT, IL-5

3. STIMOLATORI DELLA CRESCITA E DIFFERENZIAZIONE DEI LEUCOCITI IMMATURI

Ovvero i “Fattori di crescita Emopoietici”. Essi sono:

SCF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-3, IL-7

STRATEGIE “INNATE” DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Vediamo prima alcune strategie grazie le quali viene attivata una Risposta immunitaria Innata:

Come fa una cellula attaccata da un virus o un battere, ad accorgersi che qualcosa di estraneo è entrato in lei? Esistono almeno 4 meccanismi utilizzati per riconoscere microrganismi estranei durante le prime fasi di una risposta immune Innata (perciò senza chiamare ancora in causa i linfociti T e B dell'immunità Specifica), e sono:

1. Una cellula infettata riesce a riconoscere la presenza di un virus al suo interno grazie alla produzione nella cellula di acidi nucleici NON propri, cioè non tipicamente associati alla replicazione o alla sintesi proteica normale di quella cellula. Si vengono a formare infatti RNAm a doppia elica generati nel corso della replicazione del virus, che sono estranei per la cellula, e vengono riconosciuti da una proteina Kinasi cellulare che vi si lega e dà inizio ad una cascata di segnali intracellulari che portano alla produzione di INF α e INF β . (principali citochine prodotte in risposta ad una infezione virale).

2. La presenza di un virus può anche essere riconosciuta dalle cellule NK: infatti, come già sappiamo, i NK hanno delle speciali molecole recettoriali sulla loro superficie (KIR), che si legano alle molecole MHC autologhe e danno il “Segnale Inibitorio”. Il virus però, si lega anch'esso alle molecole MHC facendone diminuire il numero disponibile a legarsi ai KIR, così che non viene più trasmesso il “Segnale Inibitorio” e le cellule NK sono ora libere di svolgere la loro azione Citotossica.

3. I lipidi batterici (e in particolare quelli dei Gram negativi, cioè l'LPS), vengono riconosciuti in quanto strutturalmente diversi dai lipidi della cellula ospite. I Fagociti Mononucleati esprimono sulla loro superficie un Recettore (il CD14) in grado di riconoscere e legare questi lipidi; l'interazione fa partire una serie di trasduzioni di segnali che inducono la neosintesi da parte del fagocita di citochine quali TNF, IL-1, IL-6, IL-10.....e CHEMOCHINE, che reclutano sul posto ulteriori monociti.

4. I lipidi batterici possono anche essere riconosciuti direttamente dal sistema del COMPLEMENTO. Ricordare che: la risposta immune Innata NON ha SOLO una funzione protettiva importante nelle prime fasi di una infezione, MA serve anche ad avviare e regolare le successive risposte immuni Specifiche!

CITOCHINE DI PARTICOLARE INTERESSE

IL TNF : TUMOR NECROSIS FACTOR

Il TNF, come altri mediatori dell'immunità innata, può essere visto sotto un duplice aspetto (ricordare il lucido della **giovane donna** o **vecchia strega**) per l'organismo, in quanto innescano un circolo chiuso in cui partendo dal danno del tessuto come stimolo per produrre citochine, queste generano una risposta infiammatoria, che "aggrava" ulteriormente il danno, e il ciclo ricomincia.

Il TNF VIENE PRINCIPALMENTE PRODOTTO DA:

- Fagociti Mononucleati
- Linfociti T attivati dall'antigene
- Cellule NK attivate
- Mastociti attivati

IN RISPOSTA A:

- Batteri Gram negativi che producono come componente attiva l'LPS (il TNF è il principale mediatore della risposta dell'ospite ai batteri Gram

Ma vediamo prima quali sono le azioni dell'LPS di per sé:

- A basse concentrazioni l'LPS:
 - stimola fagociti mononucleati
 - attiva i linfociti B

quindi a basse dosi sembra che l'LPS faciliti l'eliminazione del batterio.

- Ad alte concentrazioni l'LPS:
 - produce danno tissutale
 - causa CID (coagulazione intravasale disseminata)
 - shock
 - morte.

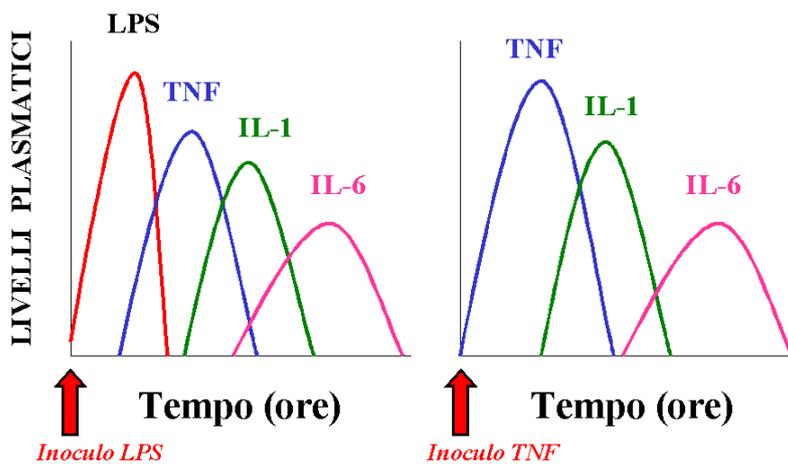
La Reazione di Schwartzman costituisce il modello per studiare gli effetti patologici dell'LPS in vivo, ed ha portato alla conclusione che il TNF è uno dei principali mediatori di tali effetti! L'esperimento di Schwartzman fu il seguente:

1. facendo 2 inoculazioni di LPS per via endovenosa in un coniglio, a distanza di 24 ore, si vide che esso moriva per CID (**Reazione Sistemica di Schwartzman**)
2. facendo una prima inoculazione di LPS per via intradermica, e poi una seconda per via endovenosa, si vide esclusivamente una zona di necrosi emorragica della cute in corrispondenza della sede di iniezione intradermica. (**Reazione Locale di Schwartzman**).

Studi recenti hanno dimostrato che l'inoculazione di TNF può praticamente sostituire l'LPS sia nella Reazione Sistemica che Locale di Schwartzman! Infatti, anticorpi anti-TNF conferiscono protezione anche verso LPS. Quindi TNF è considerato il mediatore centrale del danno tissutale indotto da LPS.

Inoltre, l'iniezione di LPS, stimola la sintesi nel plasma di ondate sequenziali di citochine, cioè l'LPS induce la produzione di TNF, che a sua volta stimola la sintesi di IL-1, la quale stimola IL-6. E' stato dimostrato che anche iniettando subito TNF, (in assenza di LPS), si ha la stessa produzione a cascata di citochine.

Produzione a cascata di citochine proinfiammatorie



STRUTTURA DEL TNF:

E' prodotto da un singolo gene localizzato sul cromosoma 6 dentro al locus per l'MHC, e viene sintetizzato come omotrimerico successivamente clivato proteoliticamente ed immesso in circolo. Si lega al suo recettore (in realtà ce ne sono due) che ha affinità un po' bassa (10^{-9}), tuttavia TNF viene sintetizzato in grandi quantità perciò può facilmente saturare il suo recettore.

AZIONI DEL TNF A BASSE DOSI: (10^{-9})

- Agisce localmente (PARACRINO)
- Aumenta l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali vascolari, perciò fa "stravasare" i leucociti dal sangue nel sito di infezione.
- Attiva i leucociti stravasati
- Stimola fagociti mononucleati a produrre CHEMOCHINE, le quali contribuiscono al "Reclutamento Linfocitario"
- Co-stimolazione dei linfociti T e produzione di immunoglobuline
- Stimola sintesi di CSF
- Aumenta l'espressione di molecole MHC classe I
- Ha un ruolo nel rimodellamento tissutale: agisce come fattore angiogenetico per la neoformazione di capillari, e come fattore di crescita per i fibroblasti favorendo la deposizione di tessuto connettivo.

Se lo stimolo per la produzione di TNF è particolarmente intenso, vengono prodotte maggiori quantità di questa citochina, che diventa in grado di entrare nel circolo ematico ed agisce quindi con un meccanismo di tipo endocrino:

Effetti Sistemici:

- Si comporta da ormone
- E' un PIROGENO ENDOGENO, agisce sulle regioni regolatorie dell'omeostasi termica nell'ipotalamo inducendo la sintesi di prostaglandine che provocano un innalzamento del set-point ipotalamico, e quindi ipertermia.
- Stimola i fagociti mononucleati a produrre IL-1 e IL-6. (Cascata di Citochine indotta da TNF).
- Stimola gli epatociti a produrre le Proteine di Fase Acuta
- Attiva la Coagulazione
- Inibisce la replicazione delle cellule staminali del midollo osseo (la somministrazione cronica di TNF può quindi indurre immunodeficienza)

Somministrazione Prolungata:

- Soppressione dell'appetito
- CACHESSIA: distrugge progressivamente adipociti e cellule muscolari. Il TNF veniva infatti chiamato "cachessina" per indicare questa sua caratteristica.

AZIONI DEL TNF AD ALTE DOSI (10⁻⁷)

- Riduce la PERFUSIONE TISSUTALE in seguito a:
 - Depressione della contrattilità miocardica
 - Riduzione della Pressione Arteriosa
 - Rilascio del tono della muscolatura liscia vasale, sia direttamente che indirettamente, stimolando la produzione da parte dell'endotelio di sostanze vasodilatatrici come l'ossido nitrico (NO).
- Causa Trombosi intravascolare e CID
- Causa gravi disturbi metabolici, quali abbassamento della glicemia fino a valori incompatibili con la vita

In Conclusione: dosi crescenti di TNF causano effetti progressivamente sempre più pericolosi!

MEDIATORI STIMOLATI DA TNF:

- Peptide Regulator Factors: IL-1, IL-6, GM-CSF, PDGF, TNF, TGF- β
- Eicosanoidi: Prostaglandine, Leucotrieni
- Ormoni: Corticotropina, Adrenalina, Noradrenalina, Glucagone

Il TNF- α può avere un ruolo nel processo apoptotico, in quanto va ad agire sui mitocondri, alterandone la permeabilità e l'omeostasi elettrochimica, provocando la fuoriuscita di alcuni fattori (es. citocromo C) capaci di attivare le Caspasi. Questa via apoptotica può essere bloccata da Bcl-2.

INTERLEUCHINA 1

L' IL-1 deve il suo nome al fatto di essere stata la prima citochina ad essere scoperta.

E' PRODOTTA DA:

- Fagociti Mononucleati
- Monociti / Macrofagi
- Altre cellule...

IN RISPOSTA A:

- LPS (endotossina dei Gram negativi)
- TNF (vedi "Produzione a Cascata delle citochine Proinfiammatorie")
- IL-1 stessa
- Contatto con linfociti T CD4

Differenze con la sintesi del TNF:

1. I linfociti T CD4 sono più efficaci dell'LPS nell'evocare la sintesi di IL-1 da parte dei Fagociti Mononucleati.
2. L'IL-1 è prodotta da diversi tipi cellulari, (es. cellule endoteliali, epiteliali), così che questa citochina può essere prodotta da Sorgenti Locali, anche in assenza di densi infiltrati macrofagi.

Esistono DUE forme di IL-1, denominate IL-1 α e IL-1 β , prodotte rispettivamente da due geni diversi. Hanno una omologia strutturale del 30%, ma la loro attività biologica è praticamente identica. Entrambe sono sintetizzate come precursori di 33 kd, successivamente clivate proteoliticamente per ottenere la forma matura di 17 Kd. Sia IL-1 α che IL 1 β si legano agli stessi recettori di membrana.

Esistono infatti DUE diversi RECETTORI di membrana per IL-1 entrambi appartenenti alla super famiglia delle Ig, essi sono:

- P80: IL-1 RT 1 (recettore di tipo I) che ha un'affinità lievemente maggiore per IL-1 β rispetto che per ma IL-1 α , esso è espresso da linfociti T, fibroblasti, epatociti e cellule endoteliali e rappresenta il principale recettore per le risposte mediate da IL-1.
- P68: IL-1 RT 2 (recettore di tipo 2) che ha un'affinità lievemente maggiore per IL-1 α ed è presente sulla membrana dei linfociti B, monociti, macrofagi e neutrofil.

Gran parte dell'attività biologica della citochina IL-1 è data da IL-1 β che si lega appunto al recettore di tipo I, il quale è in grado di trasdurre il segnale. IL-1 β può legarsi anche al recettore di tipo II che però non è in grado di trasdurre il segnale e funziona quindi da "specchietto per le allodole" in quanto sottrae IL 1 β dal legame col recettore di tipo I.

Vi è poi una terza molecola, prodotta dai Fagociti Mononucleati, strutturalmente omologa a IL-1 (e quindi in grado di legarsi ai suoi stessi recettori), ma funzionalmente inattiva. Essa agisce quindi da inibitore competitivo di IL-1 e viene detta IL-1 RA (cioè IL-1 Receptor Antagonist).

AZIONI DELLA IL-1 A BASSE DOSI:

- favorisce infiammazione locale
- agisce sulle cellule endoteliali favorendo la coagulazione
- aumenta l'espressione di molecole di adesione
- provoca il rilascio di chemochine che reclutano altri leucociti sul luogo dell'infiammazione
- stimola la proliferazione dei CD 4+
- stimola la crescita e il differenziamento dei linfociti B
- stimola molte cellule effettrici a rispondere

AZIONI DELLA IL-1 AD ALTE DOSI:

- entra nel circolo ematico, ed agisce quindi con un meccanismo di tipo endocrino
- è un pirogeno endogeno
- stimola la sintesi di proteine di fase acuta
- induce cachessia

Da notare che queste caratteristiche sono condivise con il TNF.

DIFFERENZE CON IL TNF

1. l'IL-1 non provoca danno tissutale (sebbene sia secreta in risposta all'LPS)
2. non è letale
3. non sostituisce TNF nella reazione di Shwartzman
4. non uccide le cellule tumorali
5. non aumenta l'espressione di molecole MHC I
6. potenzia, anziché sopprimere l'azione dei CSF sul midollo, quindi stimola la replicazione delle cellule staminali midollari
7. è più potente come stimolo per le cellule T

INTERLEUCHINA 2

L'IL-2 era un tempo chiamata "Fattore di Crescita dei linfociti T", in quanto è il principale mediatore capace di stimolare il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare dei linfociti T.

IL-2 ha una duplice funzione: agisce appunto come fattore di crescita per i linfociti T stimolandone la maturazione e proliferazione, ed agisce anche come fattore di trascrizione per se stessa, ovvero è capace di attivare la trascrizione dei geni che codificano per la produzione ulteriore di IL-2 e del suo RECETTORE, così da innescare un circuito di AUTO-AMPLIFICAZIONE. In questo modo, un linfocita T attivato, comincia a produrre notevoli quantità di questa citochina e se ne "auto-alimenta". IL-2 agisce quindi con un meccanismo di tipo AUTOCRINO.

E' PRODOTTA DA :

- Linfociti T attivati

DIRETTA:

- Linfociti T stessi (azione autocrina)
- Linfociti B
- Cellule NK
- Molte altre

IN RISPOSTA:

- uno stimolo antigenico

Esistono DUE diversi recettori per IL-2:

- p55: IL-2 R α , che ha una affinità di 10^{-8} M
- p70: IL-2 R β , che ha una affinità di 10^{-9} M

Di solito, comunque, i linfociti T "RESTING", cioè quiescenti, esprimono sulla loro superficie il recettore IL-2R β insieme ad un altro polipeptide denominato **catena** γ . Si forma quindi un complesso: IL-2R $\beta\gamma$ che ha però un'affinità piuttosto bassa per IL-2, cioè solo 10^{-9} M. Sono dunque necessarie elevate quantità di citochina per poter stimolare il linfocita T quiescente.

Poi, in seguito all'ATTIVAZIONE del linfocita T (es. dopo il legame con l'antigene, e dopo aver ricevuto il secondo segnale co-stimolatorio), viene prodotto ed espresso anche il Recettore α . Si pensa che IL-2R α vada ad associarsi a IL-2R $\beta\gamma$, formando un complesso con affinità molto maggiore per IL-2 (10^{-11}); saranno così sufficienti concentrazioni minori di citochina per permettere la trasduzione del segnale.

AZIONI PRINCIPALI DI IL-2:

- Fattore di crescita autocrino per i linfociti T
- Stimola la sintesi di altre citochine, quali INF γ e LT (linfotossina)
- Stimola la crescita delle cellule NK, potenziando la loro azione citotossica e generando le cosiddette LAK (Lymphokine Activated Killer)
- Stimola la proliferazione delle cellule B e la produzione di anticorpi
- Promuove l'apoptosi delle cellule T (può sembrare paradossale che l'IL-2 agisca sui linfociti T sia come "Fattore di Crescita" che come "Fattore di Morte", ma va considerato che queste azioni si verificano a stadi diversi di attivazione della cellula e non contemporaneamente, e che l'effetto pro-apoptotico di IL-2 avviene in combinazione con altri segnali quali Fas...)

LA CITOTOSSICITA': SCHEMI GENERALI

FASI EFFETTRICI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA: LA CITOTOSSICITÀ

Per citotossicità si intende l'azione tramite il quale una cellula uccide un'altra cellula. Di norma il fenomeno si verifica quando la cellula bersaglio è o infetta o neoplastica; in casi patologici il fenomeno può riguardare anche cellule che di per sé sono normalissime (autoimmunità).

La cellula infetta espone antigeni non self, mentre la cellula neoplastica può esprimere Ag tumore-specifici o avere MHC modificati. A volte la cellula neoplastica ha difficoltà ad esprimere del tutto MHC, e quindi non si hanno meccanismi inibitori dell'azione delle cellule NK come vedremo in seguito.

INTRODUZIONE GENERALE ALLA CITOTOSSICITÀ

In una azione di citotossicità possiamo riconoscere quattro diverse fasi:

- Riconoscimento del bersaglio e formazione del coniugato
- Attivazione dell'effettore (solo un alcune cellule)
- Uccisione della cellula bersaglio
- Ricircolazione

CARATTERISTICHE GENERALI DEI FENOMENI DI CITOTOSSICITÀ:

- E' importante per combattere i patogeni intracellulari: per bloccare ad esempio la produzione di virus è molto utile poter uccidere la cellula che infetta che li produce
- E' ridondante: ci sono più tipi di cellule citotossiche. La maggior parte sono rappresentate da linfociti T CD8+, ma una piccola parte di CTL può essere presente all'interno della popolazione CD4+. Tra le cellule ad azione citotossica, abbiamo le cellule Natural Killer (NK), Una volta si pensava che la loro azione non fosse MHC ristretta, in realtà vedremo che non è così.
- L'ovvio effetto benefico della citotossicità è nel caso sopracitato l'eliminazione dell'infezione, ed anche della possibile fonte di nuove infezioni (ovvero cellule producenti nuovi virioni)
- Un importante effetto patologico dell'azione citotossica è invece l'eliminazione di parenchimi nobili quando infettati, con conseguenze per l'organismo che possono essere anche molto gravi. Ad esempio, contro un fegato infetto dal virus della epatite B, si può scatenare una imponente azione citotossica che elimina le cellule infette o che presentano antigeni virali. Per azione diretta, o per i mediatori citotossici liberati in loco, può essere eliminato l'intero fegato.
- La citotossicità è un fenomeno estremamente conservato nell'evoluzione, ed è presente fin dai primi organismi viventi. Il sistema però si e poi integrato con le altre risposte immuni. L'evoluzione ha riguardato non tanto il meccanismo di azione, quanto il meccanismo di riconoscimento del bersaglio.

Gli agenti infettivi possono provocare una diversa azione citotossica, a seconda dei diversi casi:

- **Patogeno esogeno.** In questo caso si ha presentazione dell'antigene in associazione a MHC di classe II, e conseguente attivazione dei CD4+ e linfociti B. Gli anticorpi secreti dai B attivano il complemento ed inoltre, tramite il legame tra il loro Fc ed il CD16 (recettore per Fc di IgG) possono indurre una azione citotossica delle NK sul patogeno opsonizzato. Inoltre si ha anche attivazione di monociti e macrofagi anch'essi in grado di 'riconoscere' il patogeno tramite il legame CD16-Fc.
- **Patogeni intravescicolari** (di solito contenuti nei macrofagi). La presentazione avviene ancora su MHC II; si ha conseguente attivazione di CD4 e quindi delle cellule infette (i macrofagi stessi) tramite citochine prodotte dai CD4 stessi. Questo stimola grandemente l'attività di killing dei patogeni intracellulari da parte dei macrofagi.

- Nel caso di **patogeni intracellulari**, la presentazione avviene su MHC di classe I. I linfociti CD8⁺ riconoscono tramite il TCR la cellula infetta e la uccidono.
- Nel caso di una cellula neoplastica, si ha di solito modificazione dell'espressione di MHC da parte di quest'ultima. Le cellule NK non "vedono" più l'MHC e non essendo più inibite nella loro azione citotossica, uccidono la cellula.

NELL'AZIONE CITOTOSSICA DEI CTL, IL MECCANISMO DI RICONOSCIMENTO È MHC RISTRETTO

Esperimento classico di Zinkernagel e Doherty: utilizzando il virus della coriomeningite linfocitaria (CML), si infetta un topo con aptotipo H-2^K (nel topo la classe I dell'MHC viene denominata H-2), e questo animale produce CTL anti-CML. Si prendono altri due topi, uno H-2^K e uno invece H-2^D. Infettando *in vitro* i loro fibroblasti con il virus CML, i CTL del topo H-2^K, sono uccisi dai CTL di un animale con lo stesso H-2. I fibroblasti del topo H-2^D non vengono lisi. Non sono ovviamente eliminati i fibroblasti con uguale MHC (ovvero H-2^K) ma che presentano un diverso antigene. A tale fenomeno è stato dato il nome di **RESTRIZIONE PER MHC**, ad indicare che un CTL specifico per un antigene presentato su classe I può uccidere una cellula bersaglio solo se ha lo stesso MHC.

Anni dopo si è capito che tutto ciò avviene a causa della selezione positiva dei linfociti T nel timo: nel topo H-2^K i futuri CTL sono stati selezionati per interagire con H-2^K e non con uno H-2^D. Quindi *in vitro* i CTL non riconoscono il loro antigene specifico presentato da H-2^D perché quelli potenzialmente in grado di farlo semplicemente non esistono, non essendo stati selezionati positivamente nel timo durante l'ontogenesi (vedi capitolo apposito).

La restrizione MHC è valida per i CTL (CD8⁺ ed al limite in parte per qualche cellula CD4⁺) e ADCC (citotossicità mediata da anticorpi). Oggi si sa che la restrizione MHC riguarda in qualche modo anche le cellule NK.

Il fenomeno della citotossicità è molto ben conservato nell'evoluzione. Già negli anellidi (*Eisenia fetida*) troviamo le cellule progenitrici di linfociti e macrofagi, e già possiamo evidenziare fenomeni di riconoscimento ed uccisione di cellule non appartenenti all'organismo (xenogeniche).

IL fenomeno della citotossicità è stato studiato dal nostro gruppo nel verme sopraccitato. Nella cavità celomatica di questo animale sono presenti delle cellule caratterizzate dalla presenza di numerose protuberanze (cellule 'capellute'), che sono in grado di contattare molto strettamente le cellule bersaglio. Va notato che questa capacità è esclusiva delle cellule 'capellute': nel celoma sono presenti altre cellule immunitarie che svolgono un diverso ruolo. Abbiamo cioè già una specializzazione di ruoli all'interno del sistema immunitario. La cellula 'capelluta' contatta la cellula extranea e rilascia negli spazi fra le due membrane granuli citotossici che contengono una sostanza simile nella sua azione al fattore C9 del complemento.

Verosimilmente, la cellula effettrice (celomocito) uccide una cellula se quest'ultima non fornisce un segnale inibitorio, come fanno le cellule allogeniche (ovvero di un altro individuo della stessa specie). Inoltre il contenuto dei granuli non uccide cellule self.

Tutto ciò è molto simile a ciò che succede nell'uomo, abbiamo infatti:

- Specificità nel riconoscimento dell'antigene
- Necessità del contatto fra cellula

Capacità delle cellule citotossiche (ad esempio CTL nell'uomo) di non essere danneggiate dal contenuto dei propri granuli (il condroitinsolfato A protegge la cellula effettrice).

La **presenza di un segnale inibitorio** in assenza del quale si ha uccisione della cellula bersaglio è tipica nell'uomo delle cellule NK.

Questo segnale è indotto dal contatto tra molecole MHC di classe I e molecole che nella cellula NK sono responsabili della generazione di un segnale inibitorio, chiamate KIR (killer inhibitor receptors). Quando molecole MHC sono assenti (alcuni tipi di cellule neoplastiche esprimono poco MHC), o è alterato, o ha legato un peptide non self, non viene riconosciuto dai KIR delle cellule NK che, non più inibite nella propria azione, scatenano una azione citotossica. Queste molecole legano l'MHC di classe I; ne esistono tre tipi, appartenenti alla super famiglia delle immunoglobuline:

- p 70 con tre domini di tipo Ig
- p50 con due domini di tipo Ig
- p58 con due domini di tipo Ig

Le ultime due sono dette anche CD158a e CD158b

Tutte queste molecole sono proteine transmembrana con estremità N-terminale all'esterno della cellula e C-terminale nel citoplasma.

Altre molecole inibitorie non appartenenti alla famiglia delle Ig sono le **lectine di tipo C**, come Ly49 nel topo, CD94 nell'uomo. Infine sempre tra le molecole inibitorie possiamo ricordare anche una particolare forma di MHC I, l'**HLA-G**, di cui poi vedremo meglio le caratteristiche.

Va notato che le molecole KIR possono inibire l'attività citotossica non solo delle NK, dato che possono essere presenti anche sulla superficie dei CTL. Molto importanti per l'esposizione dei KIR sono il TGF- β e l'IL-15 (che le aumentano); anche alcuni prodotti virali sono in grado di attivare i KIR (ovvero certi virus provano a proteggere la cellula che hanno infettato dalla sua eliminazione).

FASE DI FORMAZIONE DEL CONIUGATO

Anche questa fase è notevolmente conservata nell'evoluzione; si ha un contatto molto stretto fra le due cellule, con stretta interdigitazione delle membrane plasmatiche. Al contatto segue una riorganizzazione del citoscheletro della cellula effettrice, che provoca una polarizzazione dei granuli verso il punto di contatto (vedi oltre).

PARTE SECONDA

Abbiamo visto che i linfociti T citotossici (CTL) sono caratterizzati dalla capacità di uccidere cellule bersaglio dopo essere venuti in contatto con esse. L'azione di uccisione è composta da una serie ordinata di eventi, e può essere ripetuta più volte su diverse cellule. Schematicamente, le tappe di questo processo sono:

- Riconoscimento del bersaglio
- Attivazione del CTL
- Esecuzione, ovvero il "bacio mortale"
- Distacco dal bersaglio colpito ed eventuale ricerca di un altro bersaglio

Nel processo di killing da parte dei CTL si ha un processo di riorganizzazione del citoscheletro, per far sì che granuli preformati all'interno della cellula si portino dal lato in cui è avvenuto il contatto col bersaglio.

Il contatto col bersaglio stesso provoca l'attivazione della cellula.

Il CTL precedentemente attivato dal contatto con l'antigene non può esplicare la sua azione se non in presenza di varie molecole costimolatorie. E' necessario cioè il secondo segnale, (oltre a quello generato dal contatto con l'antigene montato su MHC di classe I) che può provenire da varie parti. Il secondo segnale può cioè essere dato da diverse molecole, la cui azione è da considerarsi ridondante.

Nel contatto cellula-cellula sono importanti altri tipi di molecole che non il TCR.

Il primo contatto sembra essere un contatto fra molecole di carboidrati presenti sulla membrana delle due cellule, o comunque esiste una interazione tra molecole di adesione presenti sui due tipi cellulari, ed a questa segue il legame Ag:MHC-TCR

Segue una interazione fra molecole della famiglia B7 e la molecola CD28 presente sui linfociti, che rappresenta la più potente via di attivazione incontrata finora. Questo è il secondo segnale che deve necessariamente seguire il contatto fra antigene e TCR: esiste una precisa gerarchia dei legami nel processo di contatto fra le due cellule.

La produzione e l'utilizzo di citochine sono il risultato dell'attivazione del linfocita: il CTL produce citochine (prevalentemente IL-2) e ha anche il recettore per esso: è quindi in grado di autostimolarsi (meccanismo autocrino).

I linfociti a riposo hanno un catena del recettore per l'IL-2 a alta affinità che non è funzionale per dare attivazione. Il recettore risponde ad una concentrazione di IL-2 di circa 10^{-9} M.

Nel momento in cui si ha contatto con l'Ag, il linfocita diventa cellula parzialmente attivata. Viene prodotto un nuovo recettore per l'IL-2 a affinità intermedia (10^{-8} M). Questo dimerizza col recettore precedente e si forma un recettore ad affinità più alta dei due precedenti (10^{-11} M). L'IL-2 legata dal recettore può essere prodotta dal linfocita stesso o da un linfocita vicino (stimolazione autocrina o paracrina).

Un linfocita pienamente attivato è più grande e contiene molti più granuli citotossici. I granuli si riorganizzano nella cellula, polarizzandosi: si spostano cioè vicino al punto in cui è avvenuto il contatto con l'Ag. Il contenuto dei granuli viene rilasciato e va ad agire sul bersaglio stesso.

I granuli contengono diverse molecole. le principali sono:

- Perforina: è una proteina che polimerizza sulla membrana plasmatica del bersaglio, analogamente a quanto fa la proteina C9 del complemento. Vengono così formati dei pori di 16 nm sulla membrana plasmatica stessa che provocano lisi osmotica della cellula.
- Granzimes: Proteasi seriniche che entrano nel citoplasma e attivano meccanismi apoptogeni.
- Altre molecole: TNF- α e TNF- β : citochine proinfiammatorie.

Oltre a questo meccanismo citotossico, ne esiste un secondo mediato da una proteina di membrana detta Fas (o CD95). Tale molecola è peraltro coinvolta in una serie di patologie autoimmunitarie. Il Fas è una proteina di membrana (35 Kda circa, appartenente alla famiglia del CD40 e del recettore per il TNF) presente in forma monomerica. La sua trimerizzazione ne determina l'attivazione; tale attivazione, determinata dal legame con il proprio recettore o ligando naturale (FasL) media un segnale di morte cellulare programmata o apoptosi (AICD).

Il Fas L o CD95L è presente in due forme, solubile o di membrana. La forma di membrana è quella attiva: deve poter fare polimeri che a loro volta permettano la polimerizzazione del Fas. Tale azione sembra non sia possibile per la forma solubile del FasL. Questo è un meccanismo di autocontrollo dell'attivazione linfocitaria: se il FasL va sulla stessa cellula che lo produce di ha il suicidio autocrino; se va su un'altra cellula che ha il Fas la uccide. Va notato che la forma solubile di Fas ha probabilmente un compito protettivo nei confronti della cellula che lo produce.

Tutte queste 4 molecole (Fas e FasL, di membrana o solubili) possono essere presenti ed agire sulla stessa cellula o su cellule vicine.

Quando su una cellula si ha trimerizzazione del Fas, si attiva una complessa via di trasduzione del segnale:

- Al Fas trimero si lega il FADD (Fas Associated Death Domain) tramite il death domain, dominio conservato nella porzione intracitoplasmatica del Fas. Il Fadd viene così attivato
- FADD attiva una serie di enzimi tra cui la sfingomielinasi che produce ceramide (apoptogeno) da un lato e FLICE (FADD-like IL-1 converting enzyme) dall'altro
- FLICE attiva una serie di proteasi quali CED-3 Ice Like (identificata nel nematode *Caenorhabditis elegans*), importante per la degradazione di nucleoproteine.

Il legame fra Fas e FasL attiva anche una serie di caspasi intracellulari che in ultima analisi, con un meccanismo a cascata, inducono apoptosi (vedi capitolo apposito).

Il meccanismo di citotossicità mediato dal contatto cellulare è sicuramente molto antico: abbiamo visto come già in animali quali gli anellidi è possibile riconoscere un meccanismo di uccisione di cellule non self mediato da contatto cellulare. In questo caso comunque il contatto sembra essere molto più intimo rispetto a quanto accade per le cellule di mammifero, e coinvolge molecole diverse quali lectine e altre molecole "collose", non ancora identificate, che 'strappano' la membrana della cellula bersaglio.

Ricircolo: dopo il 'colpo mortale' il CTL si stacca dal bersaglio e può andare a cercare altre cellule. Diversi colpi mortali sono possibili nel corso di un test di citotossicità; ad indicare che un CTL/NK è in grado di lisare più cellule.

Metodi di studio

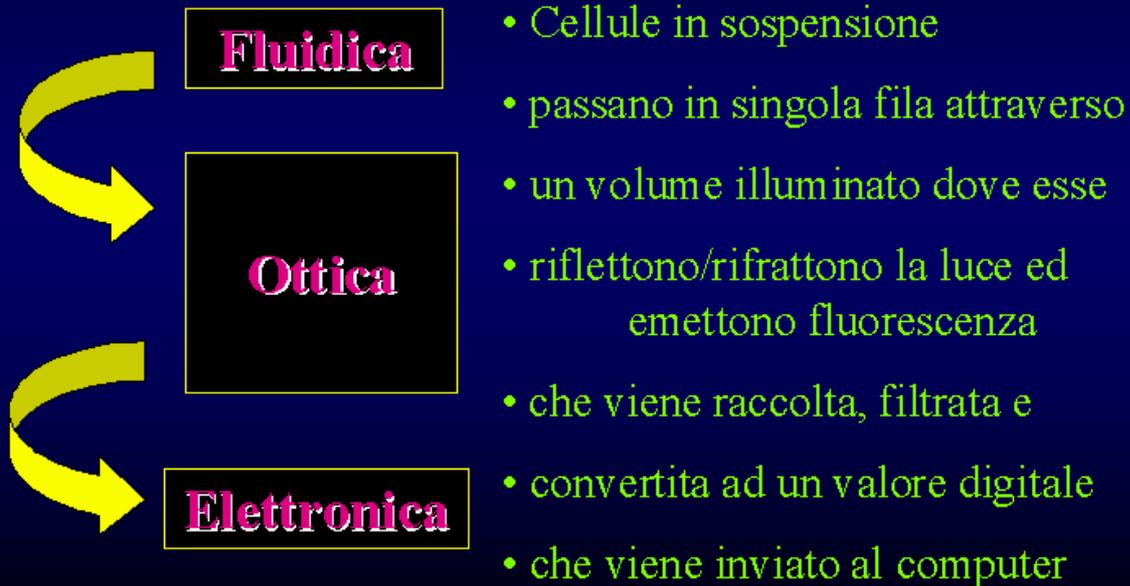
- Rilascio di ^{51}Cr dai bersagli premarcati. Si basa su una marcatura delle cellule bersaglio con Cromo radioattivo (^{51}Cr) che emette radiazioni γ . Nel momento in cui la cellula viene lisata dalla cellula killer (CTL o NK) si ha rilascio del cromo incorporato.

Esempio: si prendono cellule K562 (ottimo bersaglio per le NK perché hanno poco MHC di classe I) e si marcano con ^{51}Cr . Le cellule vengono poi piastrate assieme a linfociti o cellule NK a diversa concentrazione e per tempi diversi. Le NK uccidono i bersagli che liberano così ^{51}Cr . Si centrifuga e si raccoglie il surnatante, che risulterà tanto più radioattivo tante più cellule saranno state lisate (il ^{51}Cr rilasciato si misura in un contatore gamma, e dà valori espressi in colpi per minuto, o c.p.m.). Per calcolare la percentuale di cellule lisate in un certo campione sperimentale, si misura la radioattività minima, cioè di base (provocata dalla semplice uscita del cromo dalle cellule bersaglio sane) nel campione di controllo (considerata 0%: nessuna cellula è stata uccisa), quella in una provetta con radioattività max (100%, ottenuta lisando tutte le cellule con un detergente) e quindi si vede il valore sperimentale. Il valore di killing viene calcolato in base ai c.p.m. contati, come percentuale del campione sperimentale (da cui viene sottratto il minimo) rispetto al massimo (sottratto sempre il minimo). Si costruisce quindi una curva dose risposta.

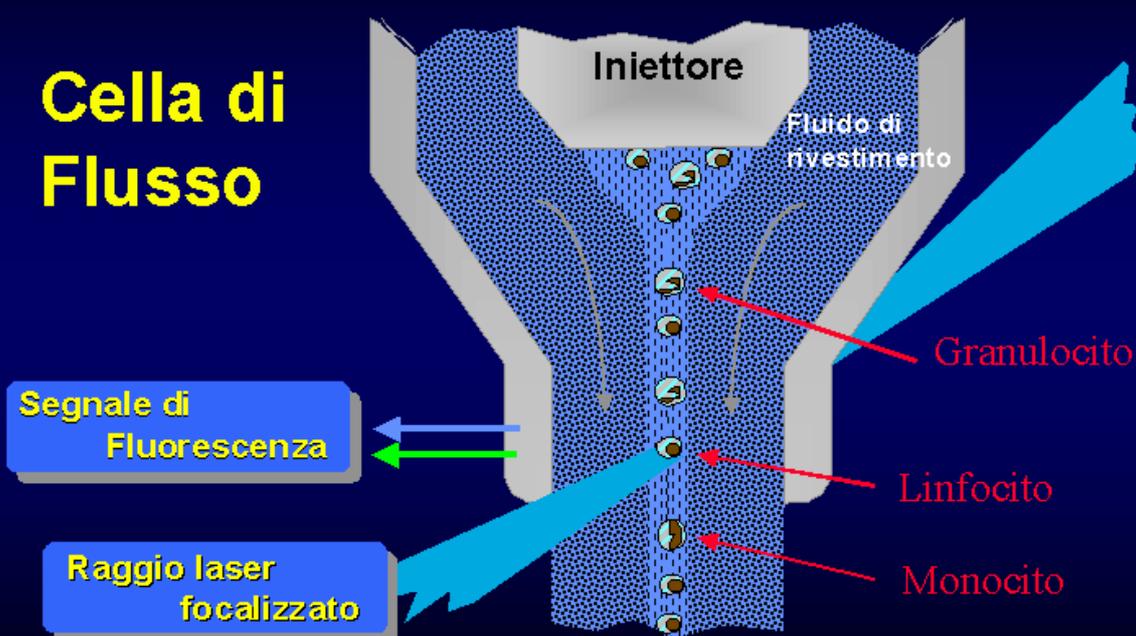
Altri metodi per lo studio dei fenomeni di citotossicità:

- Rilascio di enzimi da parte dei bersagli: di solito si utilizzano kit che misurano l'attività dell'enzima in oggetto (spesso la LDH).
- Studio del binding fra le due cellule in microscopia o citofluorimetria
- Studio del killing mediante incorporazione di Trypan blu
- Studio del ricircolo ancora con microscopia o citofluorimetria.

Basi della Citometria a Flusso

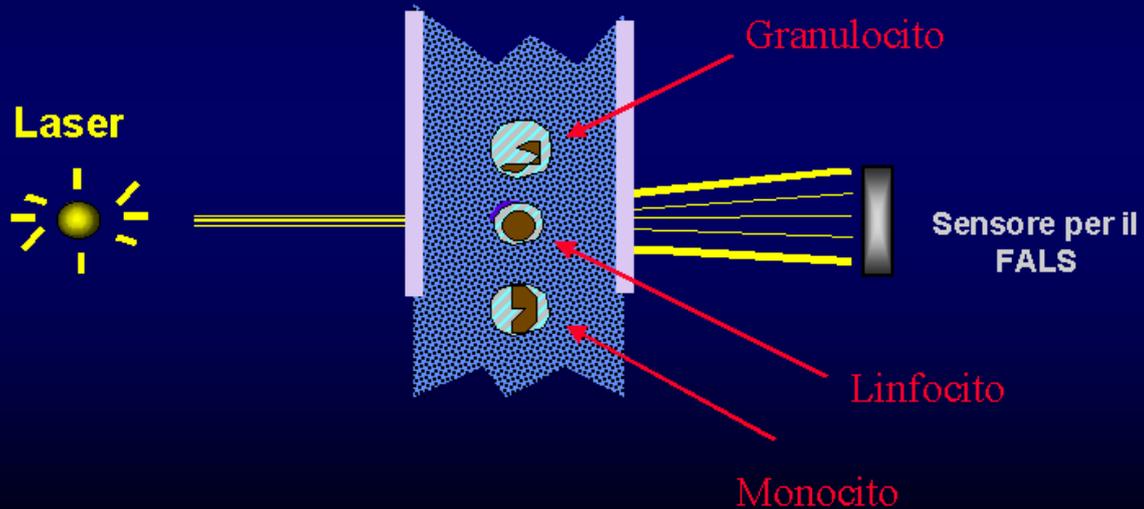


Schema generale della camera di flusso di un citofluorimetro



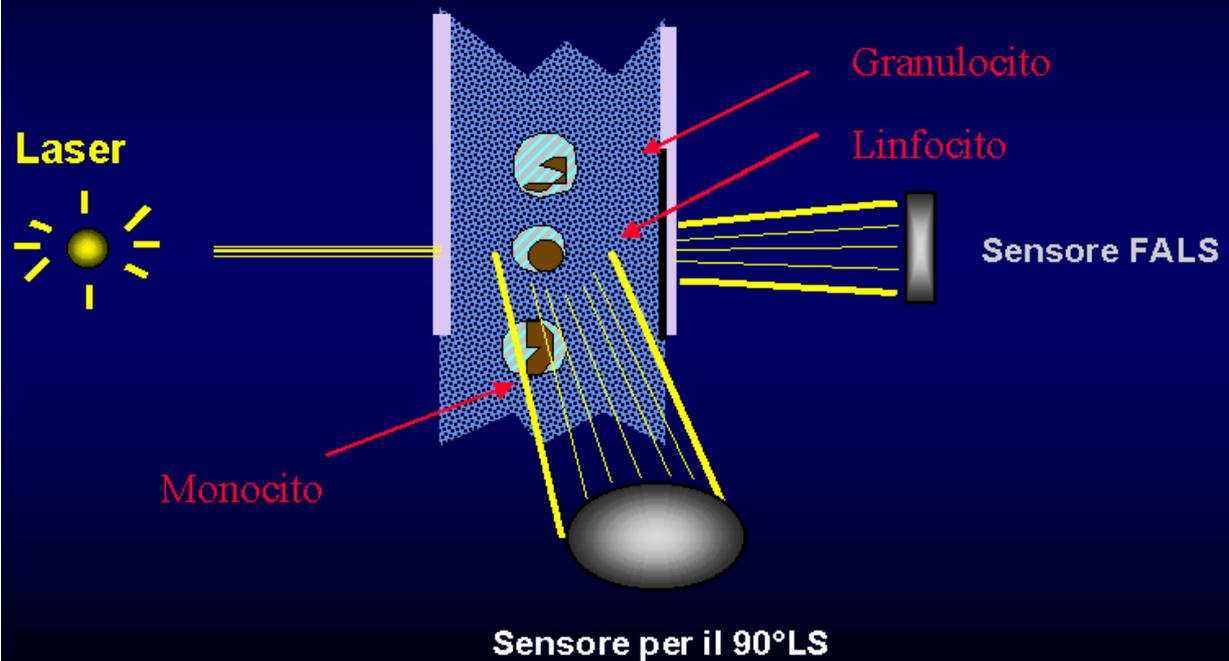
Scatter frontale

(Forward Angle Light Scatter, FALS)



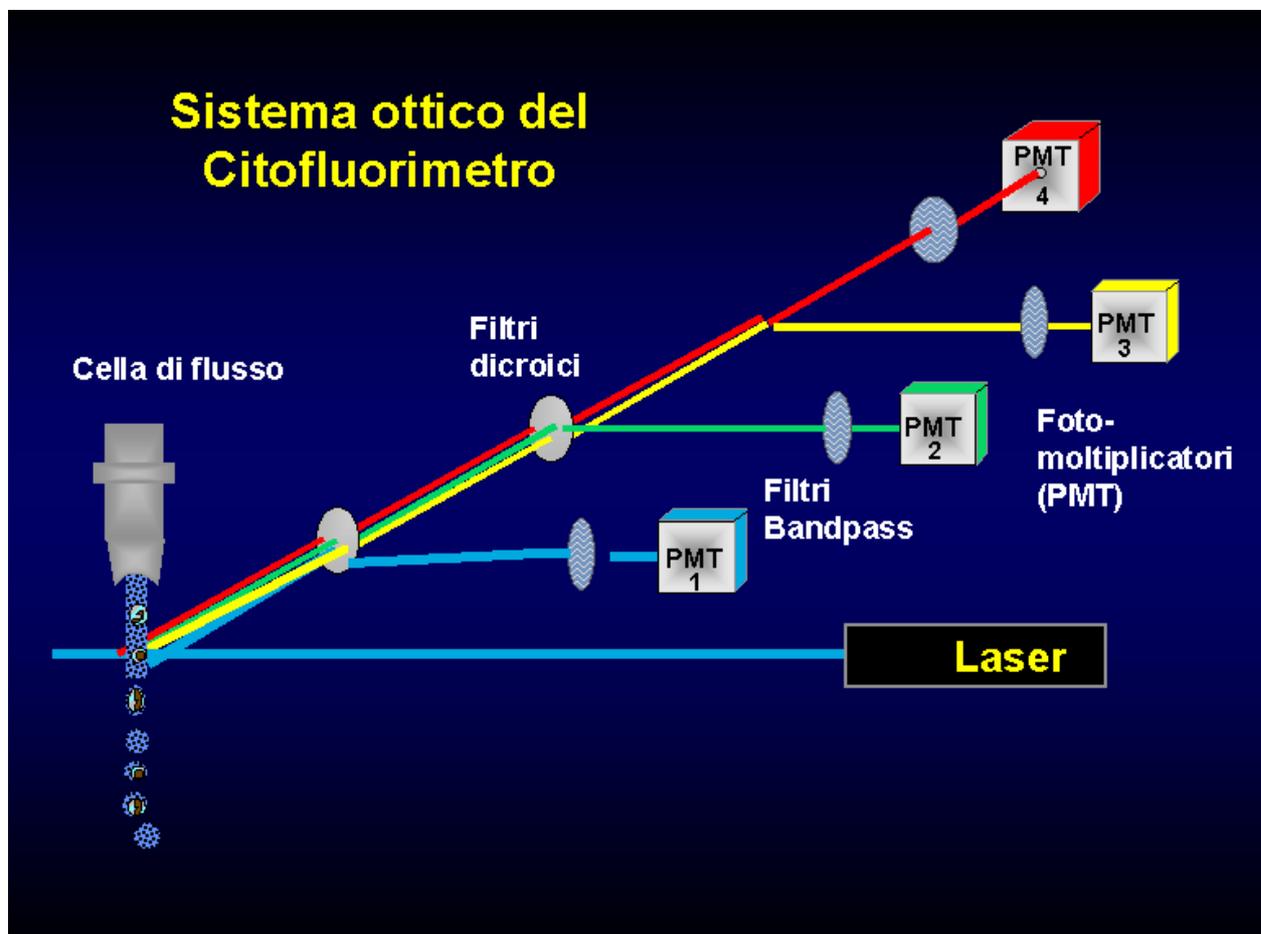
- Quando viene utilizzata una sorgente laser, la quantità di luce “scatterata” nella **direzione frontale** (ovvero lungo lo stesso asse attraverso cui viaggia la luce laser) viene raccolta nel canale del **forward scatter**
- L’ intensità del forward scatter è proporzionale alla **dimensione, forma ed omogeneità ottica** delle cellule (o delle altre particelle analizzate)

Scatter laterale (90 Degree Light Scatter)



- Quando si utilizza una sorgente laser, la quantità di luce “scatterata” lateralmente (perpendicolare all’asse attraverso cui viaggia la luce laser) viene raccolta nel canale del **side** oppure **90°scatter**
- Anche l’ intensità del side scatter è proporzionale alla **dimensione, forma ed omogeneità ottica** delle cellule (o delle altre particelle analizzate)

- Il **Forward Scatter** tende ad essere più sensibile alle proprietà della superficie cellulare delle particelle del Side Scatter
 - può essere usato per distinguere cellule **vive** da cellule **morte**
- Il **Side Scatter** tende ad essere più sensibile alle inclusioni presenti all'interno della cellula del forward scatter
 - può essere usato per distinguere cellule **granulate** da cellule **non-granulate**



Filtri ottici: rilevamento dei parametri fisici

Filtro Dicroico/Specchio a 45 gradi

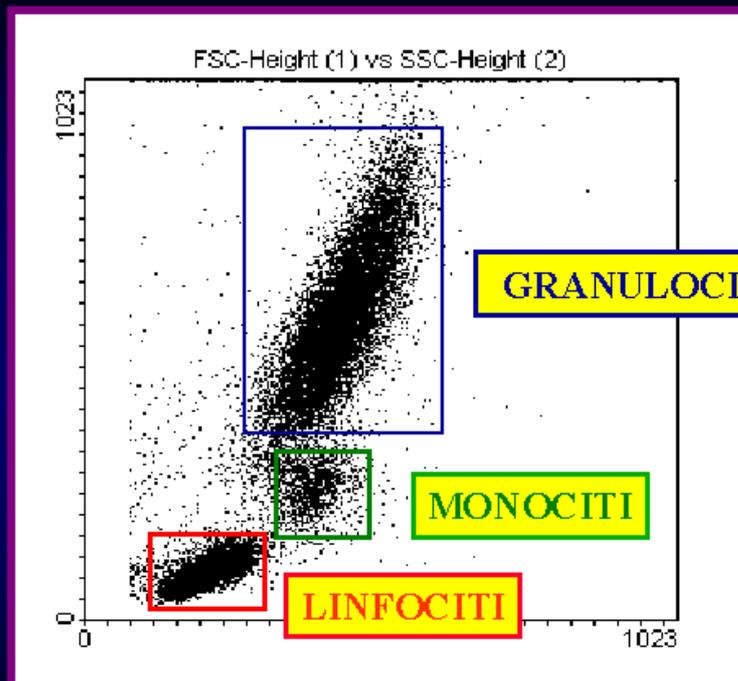
Sorgente luminosa

Luce trasmessa



Esempio di analisi dei leucociti e "gating" elettronico

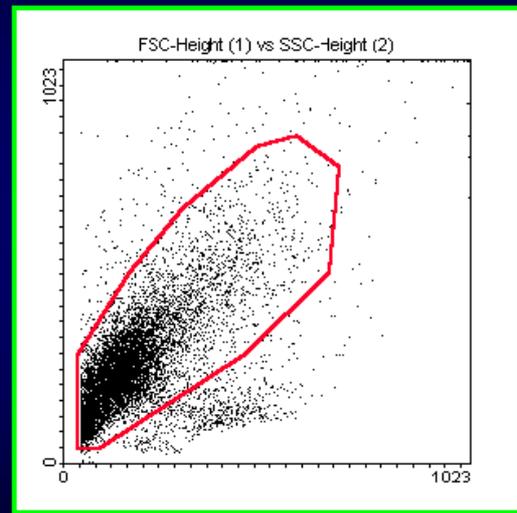
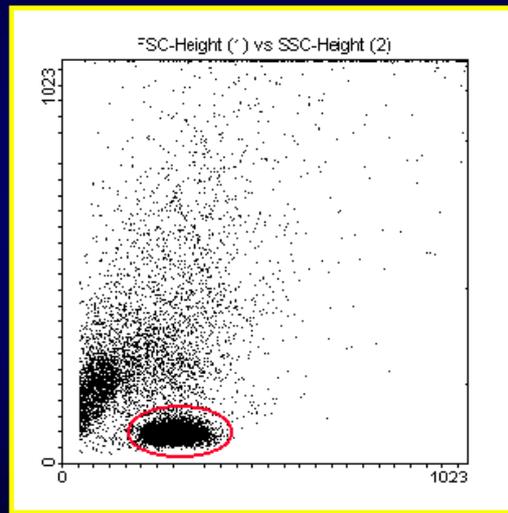
90 Degree Scatter



Forward Scatter

Nuclei di linfociti **normali** o **apoptotici**

90 Degree Scatter



Forward Scatter

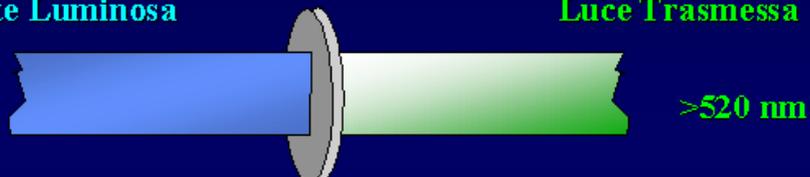
Esempi di Filtri Ottici

Standard Long Pass Filters

520 nm Long Pass Filter

Sorgente Luminosa

Luce Trasmessa



Standard Short Pass Filters

575 nm Short Pass Filter

Sorgente Luminosa

Luce Trasmessa



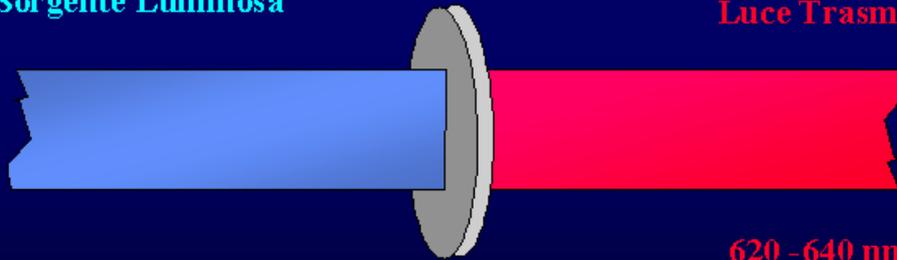
Esempi di Filtri Ottici

Standard Band Pass Filters

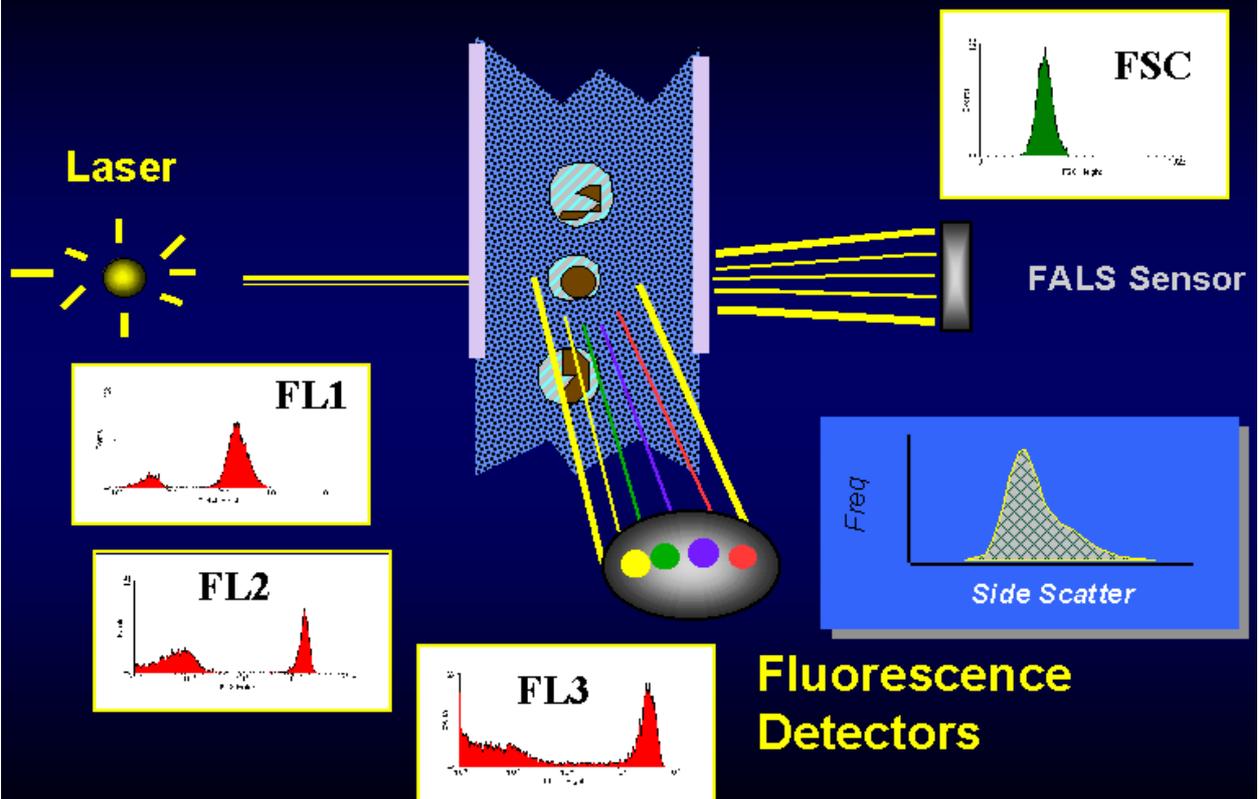
630 nm BandPass Filter

Sorgente Luminosa

Luce Trasmessa



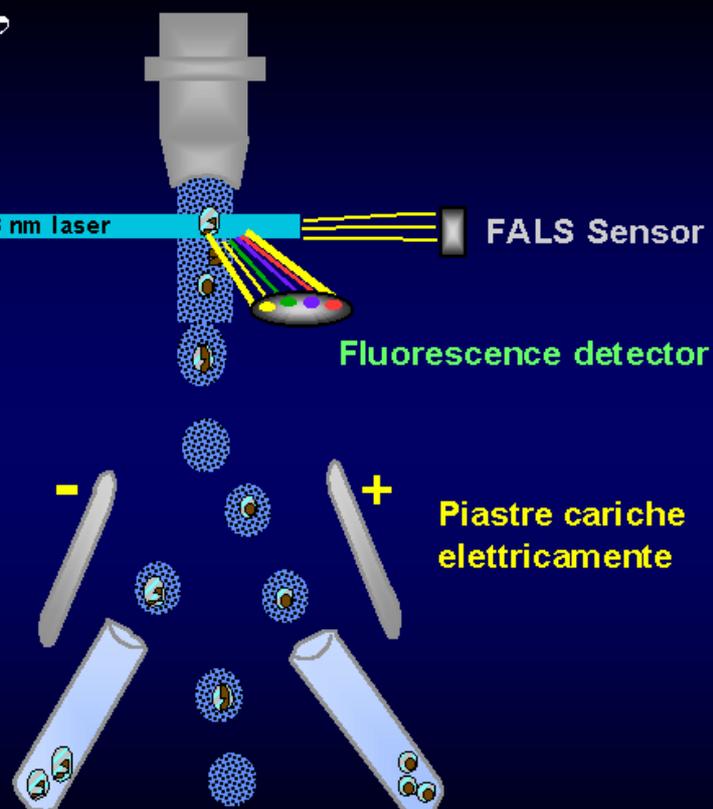
Raccolta della fluorescenza da una popolazione omogenea



Il "sorting" cellulare

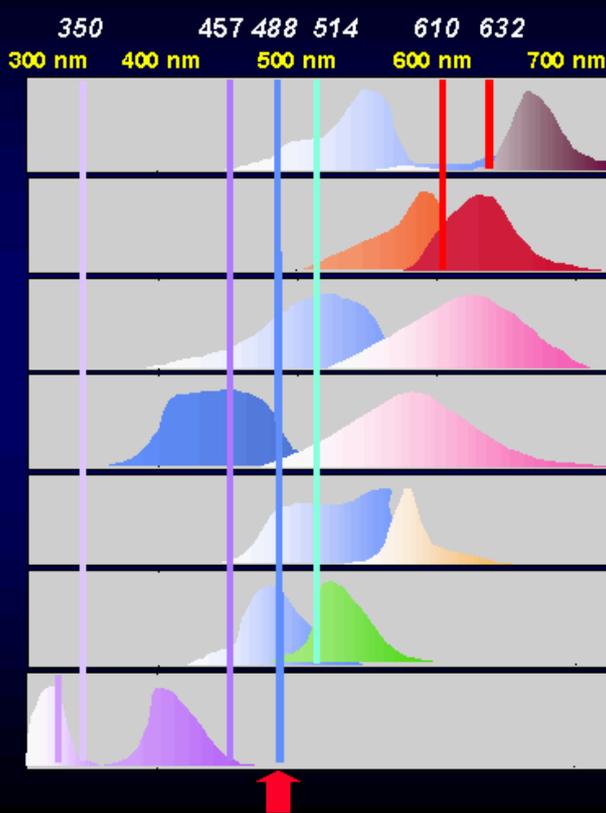
FACS:
Fluorescence
Activated
Cell
Sorting

Cellule singole
 separate dentro
 diverse provette



Fluorocromi utilizzati più comunemente

Linee
 Laser
 Comuni



Coniugato PE-TR

Texas Red

Ioduro di Propidio

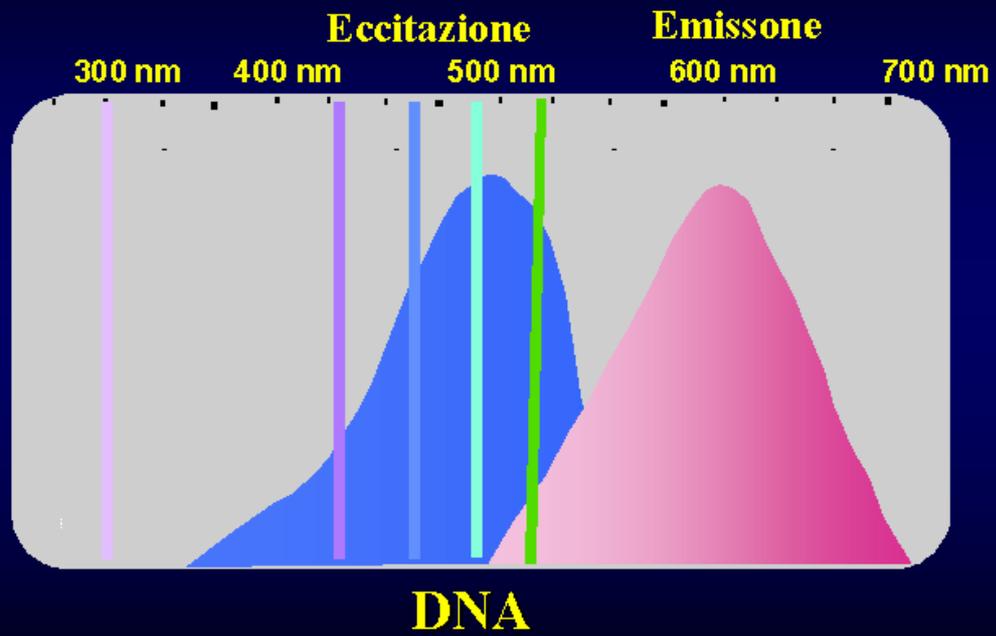
Etidio Bromuro

PE (ficoeritrina)

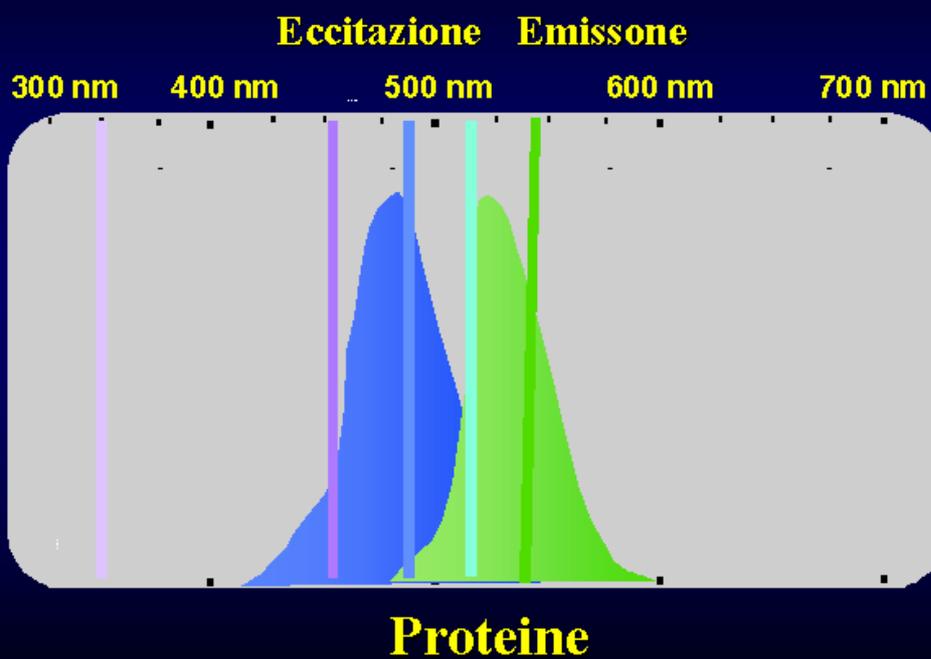
FITC (fluoresceina)

Acido cis-Parinarico

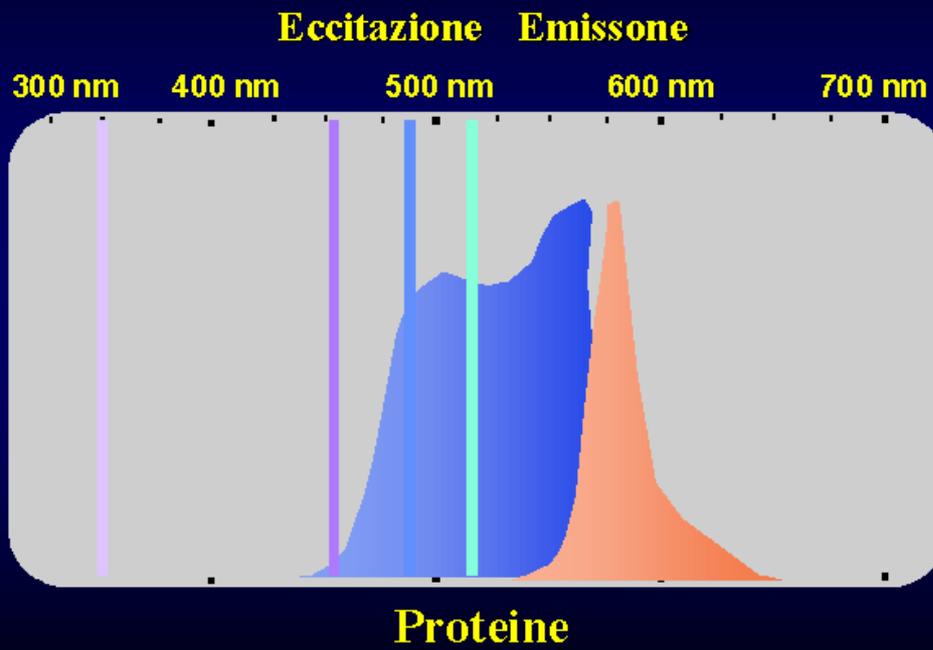
Ioduro di Propidio



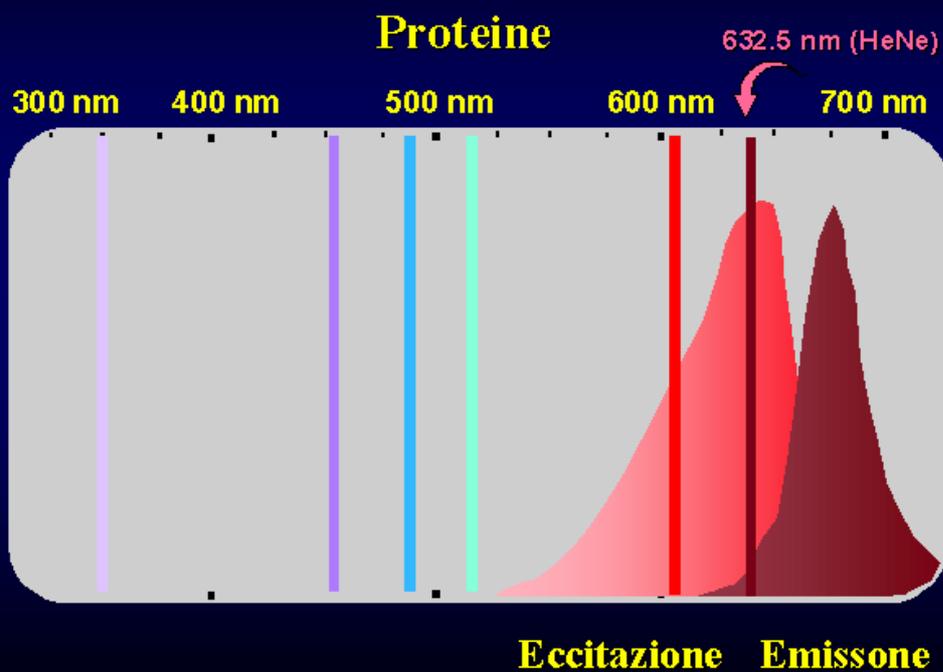
Fluoresceina (FITC)



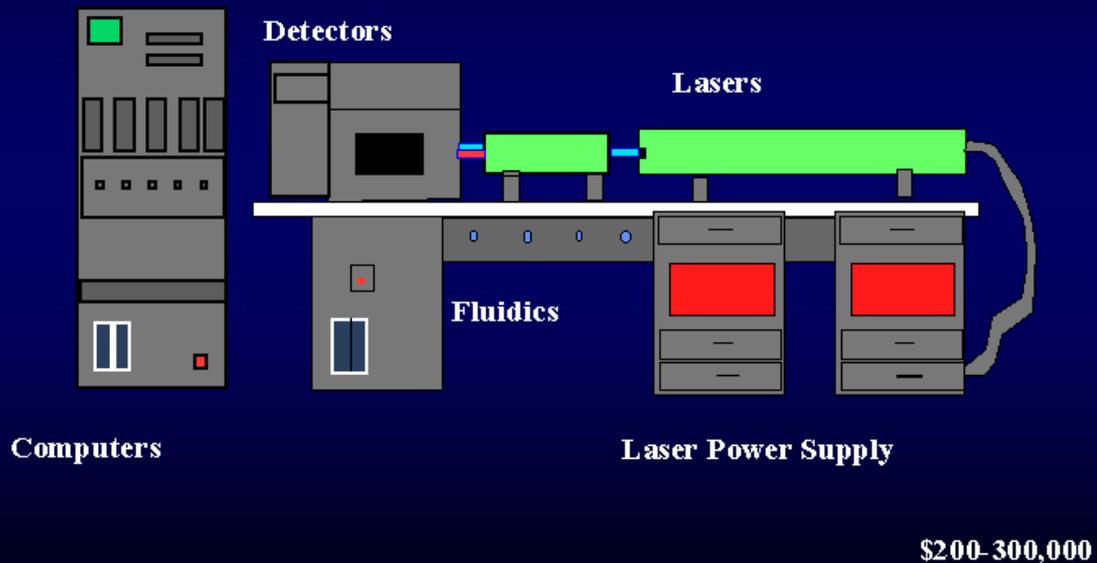
Ficoeritrina (PE)



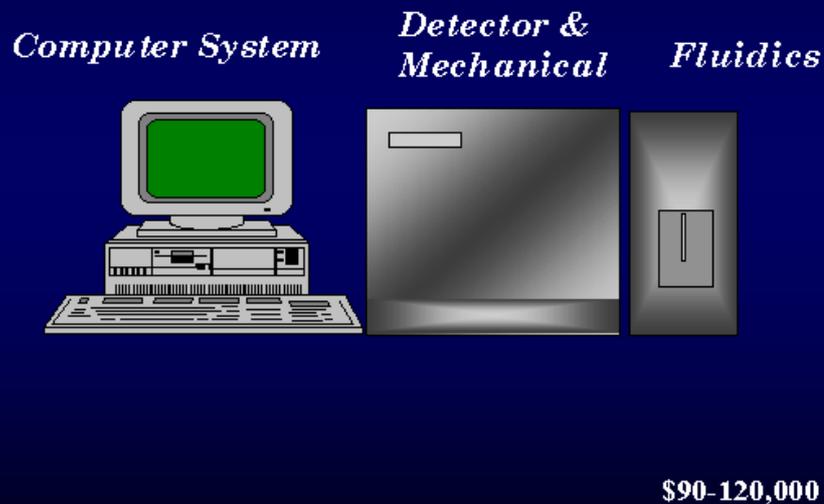
Allofococianina (APC)



Uno dei primi cell sorters (Coulter 753, 1980 circa)



Analizzatore senza opzione di sorting



Ringraziamenti

Molte delle immagini qui riportate sono state prese ed elaborate dal CD ROM N.4 della Purdue University (Paul Robinson Editor).

Il capitolo sull'aspetto tecnico della citofluorimetria è stato originariamente scritto dal Dr. R. Murphy, Pittsburgh, PA, USA.

L'APOPTOSI

(a cura di Stefano Salvioli)

Fino all'inizio degli anni Sessanta si riteneva, in base agli studi di Alexis Carrel, che le cellule fossero entità immortali e che la loro morte fosse un evento patologico legato a grossolane perturbazioni dell'omeostasi, quali ipossia, ischemia, ipertermia o avvelenamento da tossine, che portavano alla **necrosi** di vaste porzioni del tessuto colpito. La morte cellulare appariva quindi come un fenomeno non fisiologico e dannoso per l'organismo. Le successive esperienze di Leonard Hayflick dimostrarono invece che le colture *in vitro* non si mantenevano indefinitamente, ma si esaurivano spontaneamente dopo un certo numero di duplicazioni. Apparve chiaro, dunque, che le cellule invecchiavano e morivano **fisiologicamente**. Nel 1965 John Kerr, studiando i diversi quadri di morte cellulare che si verificavano negli epatociti, descrisse un nuovo tipo di morte con caratteristiche diverse da quelle della necrosi ⁽¹⁾. Nel 1972 lo stesso Kerr e Searle proposero per esso il nome di **apoptosi** ⁽²⁾, dal termine greco col quale si indica la caduta delle foglie dagli alberi o dei petali dai fiori.

Nel 1920 Freud ipotizzava l'esistenza della *pulsione di morte*, un istinto della materia vivente a tornare allo stato inorganico che, a suo modo di vedere, avrebbe agito come *primum movens* di ogni azione degli organismi viventi. Il fatto che, sessant'anni più tardi, si sia scoperto, all'interno di ogni singola cellula, un programma genetico il cui risultato ultimo è un suicidio cellulare che si realizza nelle forme dell'apoptosi, torna a proporre, in maniera più aggiornata, la vecchia teoria freudiana della pulsione verso la morte degli esseri viventi. Questo programma infatti è presente praticamente nel codice genetico di tutti gli eucarioti multicellulari ^(3,4). Tuttavia, come vedremo, l'apoptosi ha un significato biologico che si discosta alquanto dalla mera *cupio dissolvi* freudiana.

Fin dal suo apparire, lo studio della morte cellulare ha suscitato un crescente interesse negli scienziati che, nel corso degli anni, ne hanno definito le caratteristiche morfologiche e biochimiche, mentre molto resta ancora da scoprire dei meccanismi genetici che la regolano.

1.1 ASPETTI MORFOLOGICI

A differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo altresì le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti, normalmente nascosti o poco espressi, della membrana plasmatica. Questi vengono riconosciuti dalle cellule vicine, che operano la fagocitosi della cellula morente. L'organizzazione interna è mantenuta, almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare si osserva la disgregazione del/i nucleolo/i, il taglio della lamina, la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi o multipli interi di questi numeri, lunghezza che corrisponde a quella dei tratti di DNA internucleosomale. Granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo, formando spesso una caratteristica figura a mezzaluna. Frammenti discreti di materiale nucleare raggiungono in seguito la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (*blebbing*). Queste *blebs* si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare, dando origine ai cosiddetti corpi apoptotici che vengono fagocitati dalle cellule vicine. Dato che non si ha versamento di contenuto citosolico nell'ambiente, non ha origine alcun processo flogistico secondario. Tutto il processo non dura che una-due ore e colpisce solamente alcune cellule all'interno di un tessuto, rendendone così difficoltosa l'identificazione ^(5,6).

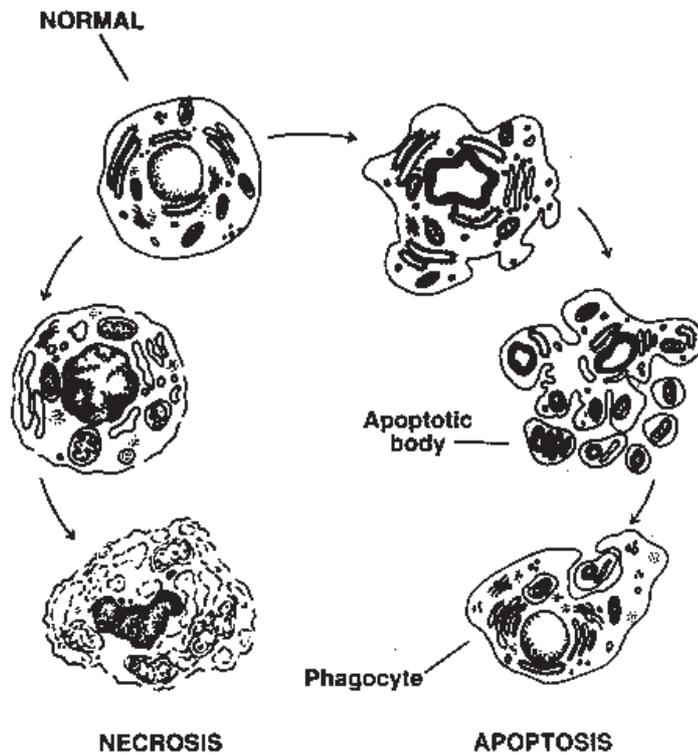


Figura 1.1 Aspetti morfologici dell'apoptosi e della necrosi. Da: Ueda e Shah, (1994) Apoptosis. *J. Clin. Lab. Med.* 124: 169-177

1.2 SIGNIFICATO BIOLOGICO

La sequenza stereotipata di eventi molecolari, biochimici e morfologici dell'apoptosi richiede una regolazione molto fine, talvolta accompagnata da espressione genica e sintesi proteica^(6, 7, 8), nonché un alto consumo di energia che ha portato fin dall'inizio a pensare che si trattasse di una forma di **morte cellulare programmata (Programmed Cell Death, PCD)**, diretta in tutto o in parte dalla cellula apoptotica stessa. La scoperta di numerosi geni, tra cui alcuni proto-oncogeni come *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *c-myb*^(9, 10), coinvolti a diverso titolo in questo processo, ha confermato tale ipotesi. In effetti, la morte cellulare per apoptosi è parte integrante dello sviluppo embrionale e fetale dell'organismo e dell'omeostasi tissutale dell'adulto.

Nell'uomo, processi apoptotici sono coinvolti in:

- sviluppo embrionale⁽¹¹⁾
- sviluppo del sistema nervoso centrale⁽¹²⁾
- atrofia tissutale endocrino-dipendente⁽¹³⁾
- *turn-over* cellulare^(14, 15)
- selezione timica^(16, 17)
- uccisione del bersaglio nelle reazioni di citotossicità⁽¹⁸⁾
- spegnimento delle risposte immunitarie⁽¹⁸⁾

Anche in numerosi processi patologici, quali, ad esempio, infezioni virali (AIDS)⁽¹⁹⁾, tumori^(20, 21) e malattie autoimmuni^(18, 22), una deregolazione dell'apoptosi può essere la base (o una delle cause) della patogenesi della malattia.

1.3 MECCANISMI MOLECOLARI

I meccanismi genetici e molecolari dell'apoptosi furono identificati per la prima volta nel Nematode *Caenorabditis elegans*, un verme costituito da un numero fisso di cellule. Durante lo sviluppo dell'animale, alcuni specifici geni si attivano, portando alla morte 131 cellule e lasciandone 959 nell'animale adulto. Basandosi sugli studi eseguiti su questo animale, si è stabilito di suddividere il processo apoptotico in 4 fasi:

- I. induzione;
- II. esecuzione;
- III. riconoscimento e fagocitosi del corpo cellulare;
- IV. degradazione dello stesso da parte della cellula fagocitica.

Questi passaggi, e i geni che li governano, sono ampiamente conservati lungo la scala evolutiva, dal verme fino all'uomo.

Nel *C. elegans* questi geni sono stati chiamati *ced* (*cell death*). Le proteine codificate dai geni *ced-3* e *ced-4* sono necessarie alla fase esecutiva del processo apoptotico⁽²³⁾. CED-3 infatti è risultata essere una proteasi in grado di tagliare le proteine tra i residui di cisteina e aspartato. Altre proteasi con una specificità analoga sono state scoperte nell'uomo e sono state chiamate **caspasi** (vedi avanti). L'attività di CED-3 è indispensabile per l'apoptosi, in quanto inattiva alcune proteine necessarie per la sopravvivenza cellulare, come, ad esempio, gli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, e ne attiva invece altre necessarie per la morte della cellula, quali le endonucleasi che degradano il DNA.

CED-4 agisce a monte di CED-3 e quando riceve un segnale di innesco agisce sulla forma immatura di quest'ultima, presente nel citoplasma, trasformandola nella forma attiva. CED-9, al contrario, agisce su CED-4 legandola e tenendola sequestrata dal citoplasma^(24, 25). In tal modo essa non può agire su CED-3 e l'apoptosi risulta bloccata. CED-9 è legata alle membrane degli organuli cellulari, e in particolar modo alla membrana mitocondriale esterna; si pensa quindi che, alternativamente a quella di *chaperon*, essa possa avere un'azione antiapoptotica direttamente collegata a questi organelli, indipendentemente dal legame con CED-4 (vedi avanti).

Nell'uomo la situazione è alquanto più complicata, ma è stato comunque possibile identificare analoghi funzionali e strutturali delle proteine CED, dimostrando così l'importanza fondamentale di queste molecole nel corso dell'evoluzione.

Il verificarsi di fenomeni di PCD anche al di fuori di fasi dello sviluppo o dell'omeostasi tissutale, ha indotto ad attribuire un ruolo fondamentale nel processo non tanto (o non solo) ad un "orologio" intracellulare, quanto piuttosto alla presenza o all'assenza di ben precisi stimoli fisici o chimici o di molecole segnale. Queste molecole, di origine esogena od endogena, innescano percorsi biochimici diversi (*private pathways*) per giungere ad attivare la fase centrale di esecuzione del programma di morte. Questa fase centrale, su cui paiono convergere tutte le *private pathways*, è stereotipata ed irreversibile (*common pathway*) e porta ai cambiamenti morfologici e biochimici tipici dell'apoptosi.

Fra le *private pathways* alcune sono ubiquitarie (ad esempio, quella innescata dalla proteina p53), altre invece sono presenti solo in alcuni specifici tipi cellulari e si attivano esclusivamente in determinati momenti (ad esempio, quella innescata dalla proteina Fas).

1.3.1 p53

Le cellule normali non hanno la capacità di proliferare indiscriminatamente, a causa dell'azione repressiva di alcuni geni ubiquitari, tra cui *p53* e *Rb*. Il prodotto di *p53* è una proteina dal peso molecolare di 53 kDa (da cui il nome) associata alla cromatina e alla matrice nucleare, sia di cellule normali che neoplastiche. La sua entrata nel nucleo è mediata dal legame con alcune proteine *chaperon*, in particolare con la *heat shock protein* Hsp70. *p53* è considerato un *tumor suppressor gene*, in quanto la sua attività è in grado di arrestare la crescita delle cellule trasformate ⁽²⁶⁾. Un danno al DNA, dovuto ad esempio a radiazioni ionizzanti, può attivare *p53*, la quale blocca la progressione del ciclo cellulare nella fase G₁, favorendo la riparazione del DNA. Se la riparazione è produttiva, il ciclo cellulare può riprendere e la cellula sopravvive; nel caso invece che il danno sia troppo esteso ed irreparabile, *p53* promuove l'apoptosi della cellula ⁽²⁷⁾.

p53 è una *DNA-binding protein*, in grado di riconoscere un motivo simmetrico di 10 bp e di attivare la trascrizione dei geni i cui *promoters* contengono copie multiple di questo motivo. In alcuni *loci*, al contrario, reprime la trascrizione. Questa regolazione genica controlla in qualche modo il ciclo cellulare. La perdita della funzione di *p53* o di *pRb*, anch'essa legata al controllo del ciclo cellulare, porta alla crescita incontrollata delle cellule affette e contribuisce alla formazione di tumori, come dimostrato da alcune patologie neoplastiche, quali la sindrome di Li-Fraumeni (mutazione autosomica dominante di *p53*), o il retinoblastoma infantile (mutazione somatica di *Rb* o delezioni della banda q14 del cromosoma 13 dove *Rb* è localizzato).

1.3.2 FAS

L'innescamento di apoptosi può essere avviato dal legame di specifiche molecole-segnale coi propri recettori posti sulla membrana plasmatica. Ne è un esempio prototipico il legame del recettore Fas col suo ligando Fas-L.

Fas, precedentemente indicato anche come APO-1, ed ora classificato come CD95, è una proteina di superficie appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF-NGF. Quando lega il suo specifico ligando, Fas-L, è in grado di indurre apoptosi ⁽²⁸⁾. Questa è mediata dal reclutamento di diverse proteine citosoliche sul cosiddetto *death domain* di Fas, che è essenziale per la generazione del segnale di morte. In pochi secondi il legame di Fas-L induce infatti la oligomerizzazione del recettore Fas, che provoca a sua volta il reclutamento delle proteine citosoliche FADD/MORT1 ad attività adattatrice. Su queste si aggancia poi una caspasi, indicata col numero 8 (precedentemente nota come FLICE/MACH) ⁽²⁹⁾. Altre caspasi sono poi di seguito attivate a cascata dalla prima, portando alla fine all'idrolisi dei loro substrati citosolici e nucleari ⁽³⁰⁾. Un altro meccanismo più lento innescato dall'interazione Fas/Fas-L è legato all'attivazione di una fosfolipasi C specifica per la fosfatidilcolina e di una sfingomielinasi acida ⁽³¹⁾. I ceramidi generati dall'idrolisi della sfingomielina inducono apoptosi nelle cellule emopoietiche, attraverso la sintesi del ganglioside GD3 ⁽³²⁾. L'apoptosi da GD3 sembra agire a valle delle caspasi, in quanto non può essere bloccata da specifici inibitori di queste ultime.

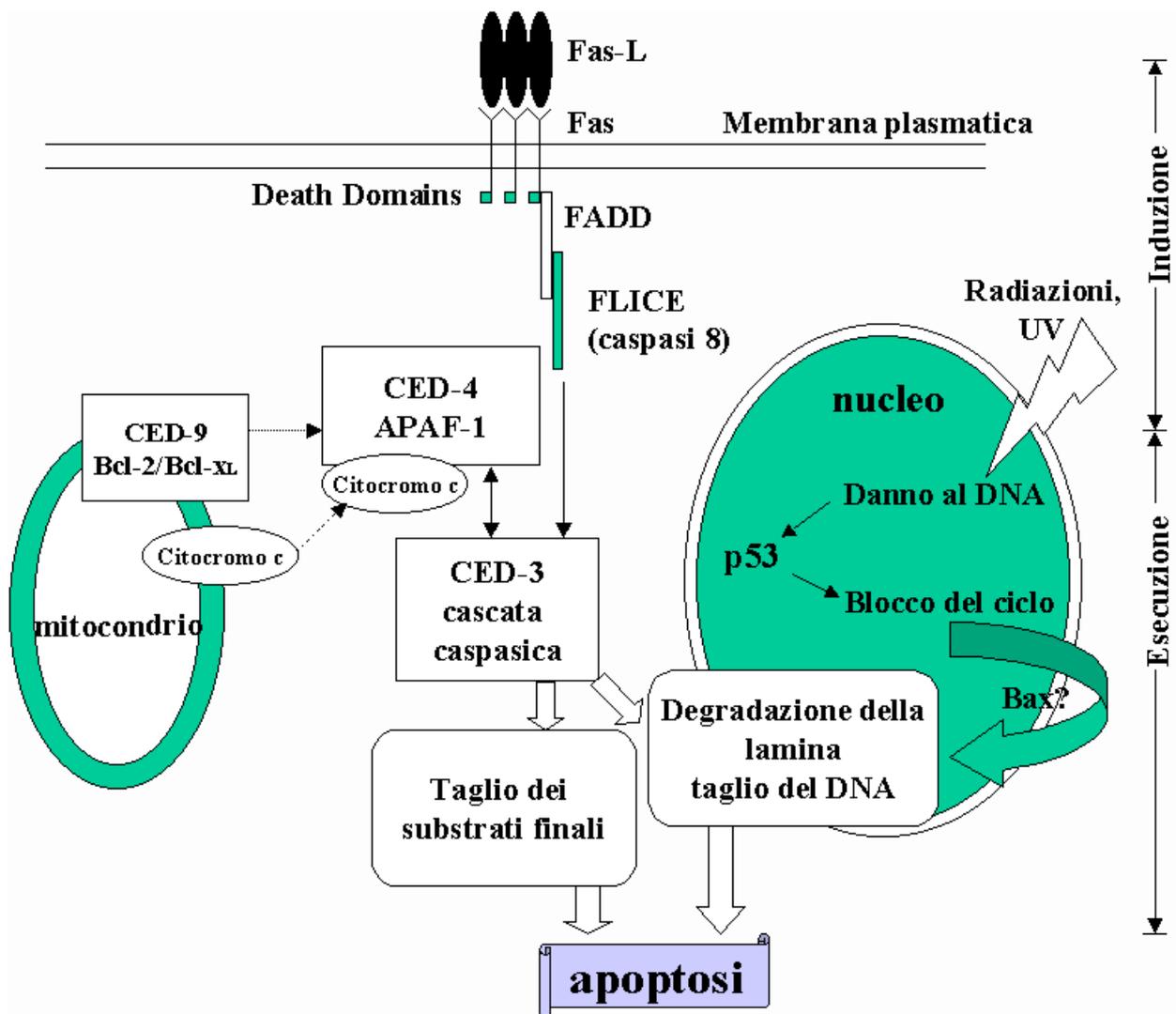


Figura 1.2 Schema riassuntivo delle fasi del processo apoptotico innescato dai geni *ced*, da Fas e da p53.

1.3.3 ALTRE VIE DI INNESCO

L'apoptosi può essere provocata in molti altri modi, ad esempio rimuovendo dal mezzo di coltura fattori importanti per la sopravvivenza cellulare, come i fattori di crescita ⁽²⁾. La mancanza di questi fattori permette lo svolgersi di un programma endogeno di *default* che porta a morte la cellula. I linfociti T, ad esempio, sono dipendenti dall'IL-2 per la loro sopravvivenza e vanno incontro a morte se questa viene a mancare. Un'altra importante causa di apoptosi è la riduzione di disponibilità di molecole di ATP. Pare infatti che esista un rapporto tra la forma difosfata e quella trifosfata dei nucleotidi adeninici (1:5) al di sotto della quale la cellula va incontro a morte ⁽³³⁾. Se il calo di ATP è massiccio ed improvviso, la cellula muore per necrosi; se invece è più moderato, per apoptosi (vedi Capitolo 3) ⁽³⁴⁾.

Anche la deregolazione di importanti messaggeri intracellulari, quali il Ca^{2+} ⁽³⁵⁾ e di enzimi regolatori quali la proteinchinasi C (PKC) ⁽³⁶⁾ può, in modo ancora non del tutto chiaro, indurre apoptosi in un'ampia varietà di tipi cellulari. Un aumento dei flussi intracitoplasmatici di Ca^{2+} avviene molto precocemente, quando la cellula è ancora vitale, e può derivare sia dall'influsso di tale ione dal *milieu* extracellulare, che dal suo rilascio dai siti di sequestro intracellulari. Tale aumento sembrerebbe implicato nel processo apoptotico a due livelli: 1) quello di trasduzione del segnale, dove il Ca^{2+} potrebbe agire a monte di altri secondi messaggeri, convergenti poi sull'attivazione di tutta una serie di proteinchinasi e/o fosfatasi in grado di regolare le molecole effettrici del processo apoptotico; 2) quello della stimolazione diretta, in un momento più tardivo, dell'attività di enzimi, come proteasi ed endonucleasi, implicati nel meccanismo di morte cellulare.

Fra le varie azioni di questo ione c'è anche quella di attivare un gruppo di enzimi chiamati transglutaminasi (TG). La TG tissutale (tTG) è una proteina monomerica globulare di 75 kDa, espressa nella maggior parte dei tessuti, responsabile di una particolare modificazione post-traduzionale delle proteine mediante formazione di legami crociati $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$ o attraverso l'incorporazione di amine biogene nelle proteine stesse ⁽³⁷⁾. Questi legami sono biologicamente irreversibili e producono una sorta di impalcatura proteica che servirebbe a mantenere l'integrità della cellula durante la formazione dei corpi apoptotici. Il ritrovamento nelle cellule apoptotiche dei prodotti di questo enzima ha suggerito l'utilizzo della tTG come marcatore per l'identificazione delle cellule morenti. Il suo ruolo specifico tuttavia non è ancora stato chiarito. Si pensa che possa partecipare al programma di morte come parte del meccanismo esecutivo del *killing*, oppure che possa modulare la cinetica del processo grazie alla sua azione stabilizzante delle proteine ⁽³⁸⁾. Recentemente è stato descritto per le TG tissutali anche un ruolo di regolazione sul prodotto del gene *Rb* (pRb), inducendo blocco del ciclo e morte cellulare ⁽³⁹⁾.

1.3.4 LA FASE DI ESECUZIONE

La fase di esecuzione sembra essere comune a tutte o quasi le vie d'innescamento ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata in un certo modo paragonabili a quelle del complemento o della coagulazione del sangue. Una volta innescata, la reazione non è più arrestabile, se non da alcune proteine virali come CrmA o da specifici inibitori peptidici del sito catalitico ⁽⁴⁰⁾, e procede automaticamente portando inevitabilmente a morte la cellula. Come per il *C. elegans*, gli enzimi coinvolti sono delle **caspiasi** (*cysteiny aspartate-specific proteinases*) ⁽⁴¹⁾, proteasi caratterizzate da un'assoluta specificità per i residui di aspartato nella posizione P1 del sito catalitico. A differenza del *C. elegans*, in cui è presente la singola caspasi CED-3, nell'uomo sono state identificate almeno 10 di tali proteine (vedi Tabella 1.1) ⁽⁴²⁾, suddivisibili in tre principali sottofamiglie: quella di ICE, che comprende, oltre ad ICE, le caspiasi 4 e 5; quella di CPP32, o caspiasi 3, l'omologo umano di CED-3, comprendente le caspiasi 6, 7, 8, 9, e 10; nonché una sottofamiglia Ich1/Nedd-2. La prima gioca un ruolo prevalentemente nei processi infiammatori, mentre la seconda è coinvolta nell'apoptosi.

Le caspiasi sono presenti in forma inattiva nel citoplasma; ognuna di esse è attivata dalla precedente e, a sua volta, attiva la seguente, fino ad arrivare al taglio dei substrati finali. Questi includono proteine coinvolte nella riparazione e duplicazione del DNA, nello *splicing* dello RNA, nel mantenimento della struttura citoscheletrica, nella divisione cellulare, nella frammentazione del DNA, ecc. (vedi Tabella 1.2).

Nuova nomenclatura	Vecchia nomenclatura
Caspasi 1	ICE
Caspasi 2	ICH-1
Caspasi 3	CPP32, Yama, Apopain
Caspasi 4	TX, ICH-2, ICE _{rel} -II
Caspasi 5	TY, ICE _{rel} -III
Caspasi 6	Mch2
Caspasi 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1
Caspasi 8	MACH, FLICE, Mch5
Caspasi 9	ICE-LAP6, Mch6
Caspasi 10	Mch4

Tabella 1.1 Nomenclatura delle caspiasi umane. Da: Porter, Ng, and Jänicke (1997) Death substrates come alive. *Bioessays* 19: 501-507, modificata

SUBSTRATO	CASPASI	LOCALIZZAZIONE CELLULARE	CONSEGUENZA DEL TAGLIO NELL'APOPTOSI	REFERENZE
attivazione di funzione				
pro-IL-1 β	Caspasi 1	citoplasma	IL-1 β regola l'apoptosi indotta da altri fattori	43
IFN- γ inducing factor	Caspasi 1	citoplasma	?	44
DFF	Caspasi 3	citoplasma	frammentazione del DNA	
PKC δ	Caspasi 3	citoplasma	induzione attività catalitica; contributo alla morte cellulare?	46
SREBPs 1, 2	Caspasi 3, 7	ER / nucleo	induzione della trascrizione; soppressione della lisi cellulare?	47
inattivazione di funzione				
D4-GDI	Caspasi 3	citoplasma	?	48
Gas2	?	microfilamenti	cambiamenti morfologici	49
Huntingtina	Caspasi 3?	citoplasma	morte di un subset di neuroni	50
α -fodrina	Caspasi 3-like	citoplasma	cambiamenti morfologici?	51
Actina?	?	varie	?	52
PARP	Caspasi 1, 3, 4, 6, 7	nucleo	accelera la frammentazione del DNA e ne inibisce la riparazione	40
DNA-PK	Caspasi 3	nucleo	inibisce la riparazione del DNA	53
U1- 70 kd	Caspasi 3	nucleo	inibisce lo splicing del RNA	53
Rb	Caspasi 3-like	nucleo	perdita dell'effetto antiapoptotico?	54
PITLSRE	Caspasi 3-like	nucleo	?	55
NuMA	?	nucleo	?	56
Laminine A, B, C	Caspasi 6	impalcatura nucleare	perdita di integrità della matrice nucleare	57
DNA topo I, II	?	impalcatura nucleare	?	56
hnRNP C1, C2	Caspasi 3-Like	nucleo	?	58

Tabella 1.2 Substrati delle caspasi (esclusi i precursori delle caspasi stesse) Da: Porter, Ng, and Jänicke (1997) *Death substrates come alive. Bioessays* 19: 501-507, modificata.

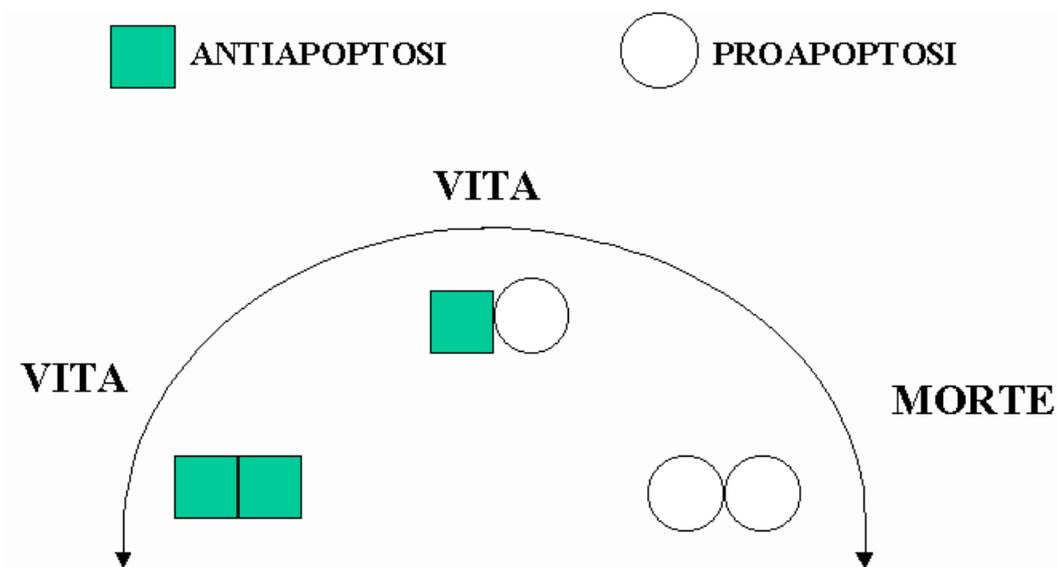
Abbreviazioni: DFF= *DNA Fragmentation Factor*; PKC δ = protein chinasi C δ ; SREBPs 1, 2= *sterol response element binding proteins*; D4-GDI= *GDP dissociation inhibitor type 4*, un inibitore delle GTPasi della famiglia Rho; Gas2= proteina codificata da un gene appartenente alla famiglia dei *growth arrest specific genes*; PARP= poli(ADP)ribosio polimerasi, DNA-PK= *DNA-dependent protein kinase*; U1-70 Kd= componente di 70 kDa della U1 *small nuclear ribonucleoprotein*; PITSLRE= superfamiglia di chinasi cdc2-like; NuMA= *Nuclear Matrix and mitotic apparatus protein*; DNA topo I, II= DNA topoisomerasi I e II; hnRNP C1 e C2= *heteronuclear ribonucleoprotein* C1 e C2.

Recentemente è stato identificato anche l'omologo umano di CED-4. Si tratta di una proteina dal peso molecolare di 130 kDa ad attività regolatrice in grado di attivare le caspasi e, per questo, indicata come **APAF-1** (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*)⁽⁵⁹⁾. Essa condivide un certo grado di omologia con CED-3 (21% di identità, 53% di similarità) e con CED-4 (22% di identità, 48% di similarità). E' risultata composta di due fattori, di cui uno ha mantenuto il nome di APAF-1, mentre l'altro ha preso quello di APAF-3, essendo APAF-2 il citocromo c, un cofattore necessario alla sua attività. Un altro cofattore importante è l'ATP. Se uno dei due non è presente, APAF-1 non è in grado di attivare la cascata delle caspasi. Come in *C. elegans*, anche APAF-1 può essere legato all'omologo umano del prodotto del gene *ced-9*. Nell'uomo, questo gene è stato identificato per la prima volta in un linfoma a cellule B, e per questo chiamato ***bcl-2***.

bcl-2 rappresenta il capostipite di una famiglia di geni che include sia membri ad attività antiapoptotica (*bcl-2*, *bcl-x_L*) che proapoptotica (*bax*, *bad*, *bak*)^(60,61). Le proteine di questa famiglia si trovano localizzate sulla membrana nucleare, su quella mitocondriale esterna e su quelle del reticolo endoplasmatico. Bcl-2 può interagire con diverse proteine, compreso R-Ras, una variante non trasformante di Ras⁽⁶²⁾, e la serin-treoninchinasi Raf-1⁽⁶³⁾, suggerendo un suo possibile ruolo modulatore su una via di trasduzione del segnale che controlla la morte cellulare. Principalmente però, Bcl-2 si lega ad altri membri della sua famiglia per formare omodimeri od eterodimeri, il cui significato funzionale varia da proapoptotico (Bax/Bax; Bcl-x_S/Bcl-x_S) ad antiapoptotico (Bcl-2/Bcl-2, Bcl-x_L/Bcl-2)⁽⁶⁴⁾. E' stata recentemente chiarita la relazione funzionale esistente tra i membri ad azione anti- e pro-apoptotica. Se all'interno di una cellula i membri proapoptotici sono in maggioranza, allora si formeranno in prevalenza dimeri che ne promuoveranno la morte; al contrario, se sono in maggioranza i membri antiapoptotici, si formeranno in prevalenza dimeri che ne promuoveranno la sopravvivenza. In presenza di uno stimolo apoptotico la sensibilità o la resistenza della cellula sarà dettata quindi dal rapporto relativo dei vari membri della famiglia all'interno della cellula stessa. I membri pro-apoptotici della famiglia, essendo in grado di sequestrare quelli antiapoptotici, fungono come una sorta di "ago della bilancia" nel determinare la sensibilità di una cellula in risposta ad un dato stimolo nocivo (vedi Figura 1.3)⁽⁶⁵⁾.

Si pensa poi che la funzione principale di queste proteine sia quella di regolare la corretta omeostasi elettrochimica degli organelli su cui sono localizzati tramite la partecipazione, con ruolo di controllo, a strutture che formano canali ionici nelle membrane. E' possibile che l'effetto diversificato di questi dimeri sia dovuto ad un diverso tipo di azione su questi canali. Tuttavia, non è da escludere che l'attività antiapoptotica di Bcl-2, similmente a quella di CED-9, possa essere basata sul legame e sequestro di APAF-1 dal citoplasma.

Da quando è stata scoperta la localizzazione di Bcl-2 nei mitocondri⁽⁶⁶⁾ e la necessità di citocromo c⁽⁶⁷⁾ per l'innesco delle caspasi, è stato ipotizzato per questi organelli un ruolo cardine nella fase di esecuzione⁽⁶⁸⁾. In effetti, in questi organelli, Bcl-2 pare essere legato a complessi sopramolecolari, formati da un dimero di porine mitocondriali VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) e da due molecole del trasportatore di nucleotidi adeninici (AdNT)⁽⁶⁹⁾. Questi complessi, localizzati nei punti di contatto tra la membrana mitocondriale interna e quella esterna⁽⁷⁰⁾, danno origine a strutture chiamate pori mitocondriali, la cui apertura è regolata da Ca²⁺, Mg²⁺, H⁺, ADP, voltaggio, ma anche dalle proteine della famiglia di Bcl-2⁽⁷¹⁾. L'apertura di questi pori provoca fenomeni di transizione di permeabilità (PT) della membrana mitocondriale, con conseguente abbassamento della differenza di potenziale elettrico ($\Delta\Psi$, vedi Capitolo 2).



Membri anti-apoptotici

Bcl-2

Bcl-x_L

Bag-1

Bcl-w

Mcl-1

Bid

Membri pro-apoptotici

Bcl-x_S

Bax

Bad

Bak

Bik-1

Figura 1.3 Regolazione della morte cellulare secondo la “teoria del reostato”
Da: Korsmeyer (1995) Regulators of cell death. **Trends Gen.** 11, 101-105, modificata.

In seguito all’innescò di un segnale apoptotico la cellula muore quando i membri pro-apoptotici sono in eccesso rispetto a quelli anti-apoptotici. Nella parte bassa della figura sono elencati i vari membri anti- e pro-apoptotici finora identificati nei mammiferi.

Questo contribuirebbe a stabilizzare l’apertura del poro, con entrata di soluti, rigonfiamento della matrice, distensione delle creste e aumento del volume mitocondriale. In conseguenza di ciò, si avrebbe la rottura della membrana esterna, con fuoriuscita di proteine localizzate nello spazio intermembrana, fra cui il citocromo c. Recentemente, è stato isolato anche un altro fattore contenuto nello stesso compartimento e in grado di indurre attivazione caspasi. E’ stato chiamato AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), e sembra vicariare il ruolo di APAF-1 ed avere esso stesso attività proteasica ⁽⁷²⁾. Di conseguenza, si può immaginare che ogni stimolo in grado di provocare una PT sufficientemente intensa, possa indurre un’apoptosi mediata dai mitocondri (vedi Capitolo 3).

1.3.5 FASI FINALI DEL PROCESSO APOPTOTICO

Il riconoscimento e la fagocitosi dei corpi apoptotici, risultanti dalla degradazione della cellula, completano il processo di morte cellulare programmata. Queste fasi, tuttavia, sono ancora poco conosciute rispetto a quelle di innesco ed esecuzione. Nei tessuti i corpi apoptotici sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti e/o dai macrofagi e degradati all'interno dei lisosomi. Sono stati finora identificati tre diversi sistemi mediante i quali i fagociti (professionali o occasionali) riconoscono i corpi apoptotici. A seconda del tipo cellulare e del fagocita interessato possono essere utilizzati il recettore delle asialoglicoproteine, quello della vitronectina (VnR)/CD36, o quello della fosfatidilserina (PS) ⁽⁷³⁾. Si pensa che la scelta del meccanismo di riconoscimento usato dai fagociti sia influenzato, oltre che dal tipo cellulare coinvolto, anche da stimoli provenienti dal microambiente. Quale che sia la modalità con cui le cellule ed i corpi apoptotici vengono riconosciuti e fagocitati, il risultato finale è sempre quello di un'eliminazione "pulita", senza sconvolgimento dell'architettura strutturale del tessuto e senza innesco di un processo flogistico.

La fase finale di degradazione è assai poco conosciuta nei suoi dettagli. Difetti in questa fase del processo sono stati messi in relazione con alcune forme di lupus eritematoso sistemico, in quanto una degradazione inappropriata potrebbe portare alla generazione di autoanticorpi anti-nucleo.

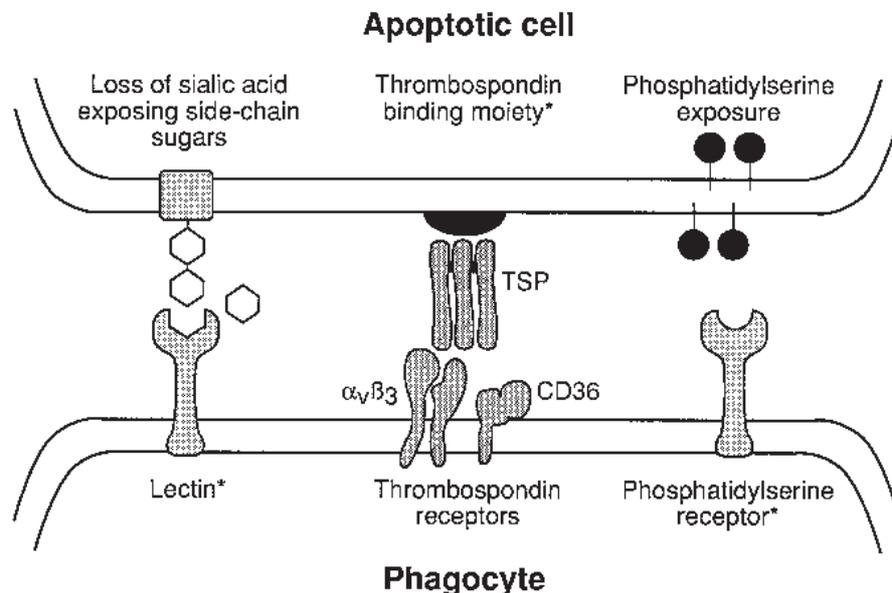


Figura 1.4 Meccanismi di riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi.
Da: Savill, Fadok, Henson, Haslett (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.

Immunol. Today 14:131-136.

- 1. Recettore delle asialoglicoproteine:** sulle membrane di alcuni tipi cellulari (es. epatociti) durante il processo apoptotico vengono esposti alti livelli di glicoproteine desialilate che vengono riconosciute dalle cellule circostanti mediante il recettore delle asialoglicoproteine.
- 2. Recettore della vitronectina (VnR)/CD36:** è il sistema più complesso e meglio caratterizzato, utilizzato dai macrofagi derivati dai monociti. Al sistema di riconoscimento partecipano tre molecole: i) *Trombospondina*: molecola trimerica, adesiva, prodotta e secreta dal macrofago, che funziona da "ponte molecolare" tra corpo apoptotico e complesso VnR/CD36; ii) *VnR*: presente sulle membrane del macrofago, è un eterodimero che appartiene alla famiglia delle integrine, molecole di membrana implicate nelle funzioni di adesione e ancoraggio cellulare; iii) *CD36*: molecola di superficie, tipicamente espressa dai monociti, dai macrofagi e dalle piastrine, la cui funzione fisiologica non è ancora ben determinata. Non è ancora stata identificata la molecola riconosciuta sul corpo apoptotico da parte di questo complesso recettoriale.
- 3. Recettore della fosfatidilserina (PS):** normalmente i residui di PS sono situati sulla faccia citoplasmatica della membrana; nelle cellule apoptotiche l'asimmetria del foglietto lipidico viene persa in seguito all'attivazione di un enzima specifico ("*scramblase*") che trasloca i residui di PS sulla faccia esterna della membrana.

1.4 FILOGENESI DELL'APOPTOSI

Come già accennato all'inizio del Capitolo, l'apoptosi sembra essere presente in tutti gli eucarioti multicellulari. Da quanto detto, essa rappresenta un fenomeno dal significato positivo per l'organismo, al punto che viene talvolta indicata come "*altruistic suicide*". L'eliminazione di cellule invecchiate, potenzialmente danneggiate, infettate da virus, trasformate, o che semplicemente non servono più, si traduce in ultima analisi in un vantaggio per l'organismo. Alla luce di questi dati, era stato ipotizzato che l'apoptosi si fosse sviluppata solo negli organismi multicellulari, probabilmente come meccanismo di difesa dalle infezioni virali ⁽⁷⁴⁾. Recentemente tuttavia, l'esistenza di fenomeni in certa misura comparabili all'apoptosi sono stati descritti anche in organismi unicellulari ⁽⁷⁵⁾. L'esistenza di questo fenomeno anche in organismi composti da una sola cellula, oltre a testimoniare la sua antichissima origine filogenetica, mette in dubbio che, nel corso dell'evoluzione, esso abbia sempre avuto il significato che oggi gli viene attribuito. In un recente articolo, Frade e Michaelidis ⁽⁷⁶⁾ hanno proposto che l'apoptosi sia una conseguenza del passaggio al metabolismo aerobio con l'assunzione simbiotica dei mitocondri da parte delle cellule eucariotiche. L'ipotesi nasce dall'osservazione che l'entrata di parassiti batterici nei loro ospiti cellulari utilizza, in alcuni casi particolari, porine prodotte dai parassiti stessi, in grado di localizzarsi sulle membrane dell'ospite ⁽⁷⁷⁾. Sorprendentemente, queste porine batteriche sono regolate in modo analogo alle VDAC mitocondriali: entrambe interagiscono con l'ATP, diminuendo la grandezza del poro e causando uno slittamento della voltaggio-dipendenza e della selettività ionica ⁽⁷⁸⁾. Altre somiglianze strutturali (foglietti β invece di α -eliche nella porzione transmembrana) suggeriscono un'origine evolutiva comune per queste proteine. Le porine batteriche, inserite nella membrana dell'ospite, in mancanza di ATP, si aprirebbero provocando un'entrata incontrollata di soluti, fra i quali il Ca^{2+} e, conseguentemente, l'apoptosi. Data la stretta parentela di queste porine con le VDAC, è possibile che l'innescò dell'apoptosi, causato da fenomeni di PT dovuti alle VDAC, sia un retaggio ancestrale dell'assunzione stabile di endosimbionti procariotici che, col tempo, sarebbero diventati gli attuali mitocondri. In questo caso l'apoptosi sarebbe da considerare come un epifenomeno conseguente al passaggio dal metabolismo anaerobio a quello aerobio, piuttosto che una strategia appositamente selezionata dall'evoluzione per l'eliminazione di cellule danneggiate. Di segno opposto è l'ipotesi proposta da V.P. Skulachev ⁽⁷⁹⁾, che propone un modello teleologico di interpretazione. È noto che i radicali liberi dell'ossigeno (RLO), prodotti per la maggior parte nei mitocondri e potenzialmente mutagenici per la cellula, sono in grado di indurre apoptosi. Alti livelli di RLO possono attivare fenomeni di PT, che servirebbero quindi per eliminare i mitocondri difettosi produttori di RLO. Se la maggior parte dei mitocondri risulta produrre RLO, allora la PT sarà sufficientemente potente da innescare l'apoptosi e tutta la cellula danneggiata verrà eliminata.

Manifestazioni simili all'apoptosi degli eucarioti (taglio e compattazione del DNA, degradazione dello RNA, restringimento del corpo cellulare con perdita di materiale genetico) sono state rilevate recentemente anche in organismi procariotici. Hochman ha proposto di identificare questi fenomeni col nome di **proapoptosi**, suggerendo un'origine evolutiva comune con l'apoptosi dei metazoi ⁽⁸⁰⁾.

BIBLIOGRAFIA

- Kerr J.F.R. (1965) A histochemical study of hypertrophy and hischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. **J. Pathol. Bacteriol.** 90: 419-435
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26: 239-257
- Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. **Annu. Rev. Cell Biol.** 7:663-398
- Raff M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. **Nature** 356: 397-400
- Majno G, Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. **Am. J. Pathol.** 146: 3-15
- Golstein P., Ojcius D.M., Young J. D-E. (1991) Cell death mechanisms and the immune system. **Immunol. Rev.** 121: 29-65
- Cohen J.J., Duke R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocytes nuclei leads to cell death. **J. Immunol.** 132: 38-42
- McConkey D.J., Hartzell P., Orrenius S. (1990) Rapid turnover of endogenous endonuclease activity in thymocytes: effects of macromolecular synthesis inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.** 278: 284-287
- Buttayan R., Zakeri Z., Lockshin R., Wolgemuth D. (1988) Cascade induction of *c-fos*, *c-myc*, and heat shock 70k transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. **Mol. Endocrinol.** 2: 605-657
- Grassilli E., Carcereri de' Preti A., Monti D., Troiano L., Menegazzi M., Barbieri D., Franceschi C., Suzuki H. (1992) Studies of the relationship between cell proliferation and cell death. II. Early gene expression during concanavalin A-induced proliferation and dexamethasone-induced apoptosis of rat thymocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 188: 1261-1266
- Kerr J.F.R., Harmon B.V. (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: **Apoptosis: the molecular basis of cell death**, Tomei L.D. and Cope F.O. Eds, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 5-29
- Naruse I., Keino H., (1995) Apoptosis in the developing CNS. **Prog. Neurobiol.** 47: 135-155
- Kyprianou N., Isaacs J.T. (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. **Endocrinology** 122: 522-529
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev Cytol.** 68: 251-306
- Lynch M.P., Nawaz S., Gerschenson L.E. (1986) Evidence for soluble factors regulation cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 4784-4790
- Kappler J.W., Wade T., White J., Kushnir E., Blackman M., Bill J., Roehm N., Marrack P. (1987) A T cell receptor V β segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. **Cell** 49: 263-271
- MacDonald H.R., Schneider R., Lees R.K., Howe R.C., Acha-Orbea H., Festenstein H., Zinkernagel R.M., Hengartner H. (1988) T cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mlsa-encoded antigens. **Nature** 332: 40-45

- Cohen J.J., Duke R.C. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu. Rev. Immunol.** 10: 267-293
- Banda N.K., Bernier J., Kurahara D.K., et al. (1992) Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp 120 primes T cells for activation-induced apoptosis. **J. Exp. Med.** 176: 1099-1106
- Wright S.C., Zhong J., Larrick J.W. (1994) Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. **FASEB J.** 8: 654-660
- Wyllie A.H., Rose K.A., Morris R.G., Steel C.M., Forrest E., Spandidos D.A. (1987) Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. **Br. J. Cancer** 56: 251-259
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defect in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature** 356: 314-317
- Hengartner M.O., Ellis R.E., Horvitz R.H. (1992) *Caenorabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. **Nature** 356: 494-499
- Chinnaiyan A.N., O'Rourke K., Lane B.R., Dixit V.M. (1997) Interactions of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. **Science** 275: 1122-1126
- Wu D., Wallen H.D., Nuñez G. (1997) Interactions and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. **Science** 275: 1126-1129
- Packham G., Cleveland J.L. (1995) *c-myc* and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta** 1242: 11-28
- Cotter T.G., McCarthy J. (1994) Genes and apoptosis. **Biochem. Soc. Transact.** 22: 591-593
- Nagata S., Golstein P. (1995) Fas death factor. **Science** 267: 1449-1456
- Chinnaiyan A.N., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell** 81: 505-512
- Enari M., Hug H., Nagata S. (1995) Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. **Nature** 375: 78-81
- Cifone M.G., De Maria R., Roncaioli P., Rippo M.R., Azuma M., Lanier L.L., Santoni A., Testi R. (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/APO-1) activates an acidic sphingomyelinase **J. Exp. Med.** 180: 1547-1552
- De Maria R., Lenti L., Malisan F., d'Agostino F., Tomassini B., Zeuner A., Rippo M.R., Testi R. (1997) Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. **Science** 277: 1652-1655
- Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. (1996) Control of apoptosis by the cellular ATP level. **FEBS Lett.** 378: 107-110
- Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S., Nicotera P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.** 185: 1481-1486
- Richter C., Kass G.E.N. (1991) Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chem. Biol. Interact.** 77: 1-23

- Bertrand R., Solary E., O'Connor P., Kohn K.W., Pommier Y. (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. **Exp. Cell Res.** 211: 314-321
- Fesus L., Thomazy V., Falus A. (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. **FEBS Lett.** 224: 104-108
- Nemes Z. Jr., Adány R., Balázs M., Boross P., Fesus L. (1997) Identification of cytoplasmic actin as an abundant glutaminyl substrate for tissue transglutaminase in HL-60 and U937 cells undergoing apoptosis. **J. Biol. Chem.** 272: 20577
- Oliverio S., Amendola A., Di Sano F., Farrace M.G., Fesus L., Nemes Z. Jr., Piredda L., Spinedi A., Piacentini M. (1997) Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. **Mol. Cell Biol.** 17: 6040-6048
- Kumar S., Lavin M.F. (1996) The ICE family of cysteine protease as effectors of cell death. **Cell Death Diff.** 3: 255-267
- Alnemri E.S., Livingstone D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell** 87: 171
- Porter A.G., Ng P., Jänicke R.U. (1997) Death substrates come alive. **Bioessays** 19: 501-507
- Friedlander R.M., Gagliardini V., Rotello R.J., Yuan J. (1996) Functional role of interleukin 1 β (IL-1 β) in IL-1 β -converting enzyme mediated apoptosis. **J. Exp. Med.** 184: 717-724
- Gu Y. et al. (1996) Activation of interferon- γ inducing factor by interleukin-1 β converting enzyme. **Science** 275: 206-209
- Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that function downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell** 89: 175-184
- Emoto Y. et al. (1995) Proteolytic activation of protein kinase C γ by an ICE-like protease in apoptotic cells. **EMBO J.** 14: 6148-6156
- Pai J-T., Brown M.S., Golstein P. (1996) Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 5437-5442
- Danley D.E., Chuang T-H., Bokoch G.M. (1996) Defective Rho GTPase regulation by IL-1 β -converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. **J. Immunol.** 157: 500-503
- Brancolini C., Benedetti M., Schneider C. (1995) Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. **EMBO J.** 14: 5179-5190
- Goldberg Y.P., Nicholson D.W., Rasper D.M., Kalchman M.A., Koide H.B., Graham R.K., Bromm M., Kazemi-Esfarjani P., Thornberry N.A., Villancourt J.P., Hayden M.R. (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. **Nat. Genet.** 13: 442-449
- Cryns V.L., Bergeron L., Zhu H., Li H., Yuan J. (1996) Specific cleavage of α -fodrin during fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin 1 β -converting enzyme/ced3 protease distinct from the poly(ADP)ribose polymerase protease. **J. Biol. Chem.** 271: 31277-31282

- Kalayar C., Ord T., Pia Testa M., Zhong L.-T., Bredesen D.E. (1996) Cleavage of actin by an interleukin 1 β - converting enzyme to reverse Dnase I inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 2234-2238
- Song Q., Lees-Miller S.P., Kumar S., Zhang Z., Chan D.W., Smith G.C., Jackson S.P., Alnemri E.S., Litwack G., Khanna K.K., Lavin M.P. (1996) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. **EMBO J.** 15: 3238-3246
- Jänicke R.U., Walker P.A., Lin X.Y. and Porter A. G. (1996) Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. **EMBO J.**15: 6969-6978
- Lahti J.M., Xiang J., Heath L.S., Campana D., Kidd V.J. (1995) PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. **Mol. Cell Biol.** 15: 1-11
- Casiano C.A., Martin S.J., Green D.R., Tan E.M. (1996) Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/Apo-1)-mediated T cell apoptosis. **J. Exp. Med.** 184: 765-770
- Rao L., Perez D., White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. **J. Cell Biol.** 135: 1441-1455
- Waterhouse N., Kumar S., Song Q., Strike P., Sparrow L., Dreyfuss G., Alnemri E.S., Litwack G., Lavin M., Watters D. (1996) Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases in apoptosis. **J. Biol. Chem.** 271: 29335-29341
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell** 90: 405-413
- Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988) *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre- β cells. **Nature** 335: 440-442
- Reed J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **J. Cell Biol.** 124: 1-6
- Fernandez-Sarabia M. and Bischoff J.R. (1993) Bcl-2 associates with the *ras*-related protein R-ras p23. **Nature** 366: 274-275
- Wang H.G., Miyashita T., Takayama S., Sato T., Torigoe T., Krajewski S., Tanaka S., Hovey L., Troppmair J., Rapp U.R., and Reed J.C. (1994) Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. **Oncogene** 9: 2751-2756
- Cory S. (1995) Regulation of lymphocytes survival by the *bcl-2* gene family. **Annu. Rev. Immunol.** 13: 513-543
- Korsmeyer S.J. (1995) Regulators of cell death. **Trends Gen.** 11, 101-105
- Monaghan P., Robertson D., Amos T.A., Dyer M.J., Mason D.Y., Greaves M.F. (1992) Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. **J. Histochem. Cytochem.** 40: 1819-1825
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell** 86: 147-157
- Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H.G., Geley S., Fassy F., Reed J.C., Kroemer G. (1997) The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. **J. Exp. Med.** 186: 25-37

- Zoratti M., Szabò I. (1995) The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta** 1241: 139-176
- Hockenbery D., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature** 348: 334-338
- Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J. Exp. Med.** 183: 1533-1544
- Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **J. Exp. Med.** 184: 1331-1341
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunol. Today**, 14, 131-136.
- Vaux D.L., Haecker G, Strasser A. (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell** 76: 777-779
- Ameisen J.C. (1996) The origin of programmed cell death. **Science** 272: 1278-1279
- Frade J.M., Michaelidis T.M. (1997) Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? **Bioessays** 19: 827-832
- Weel J.F.L., van Putten J.P.M. (1991) Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. **Res. Microbiol.** 142: 985-993
- Rudel T., Schmid A., Benz R., Kolb H.-A., Lang F., Meyer T.F. (1996) Modulation of Neisseria porin (porB9) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. **Cell** 85: 391-402
- Skulachev V.P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? **FEBS Lett.** 397: 7-10
- Hochman A. (1997) Programmed cell death in prokaryotes. **Crit. Rev. Microbiol.** 23: 207-214

SCHEMI SULL'APOPTOSI & IMMAGINI PROIETTATE A LEZIONE

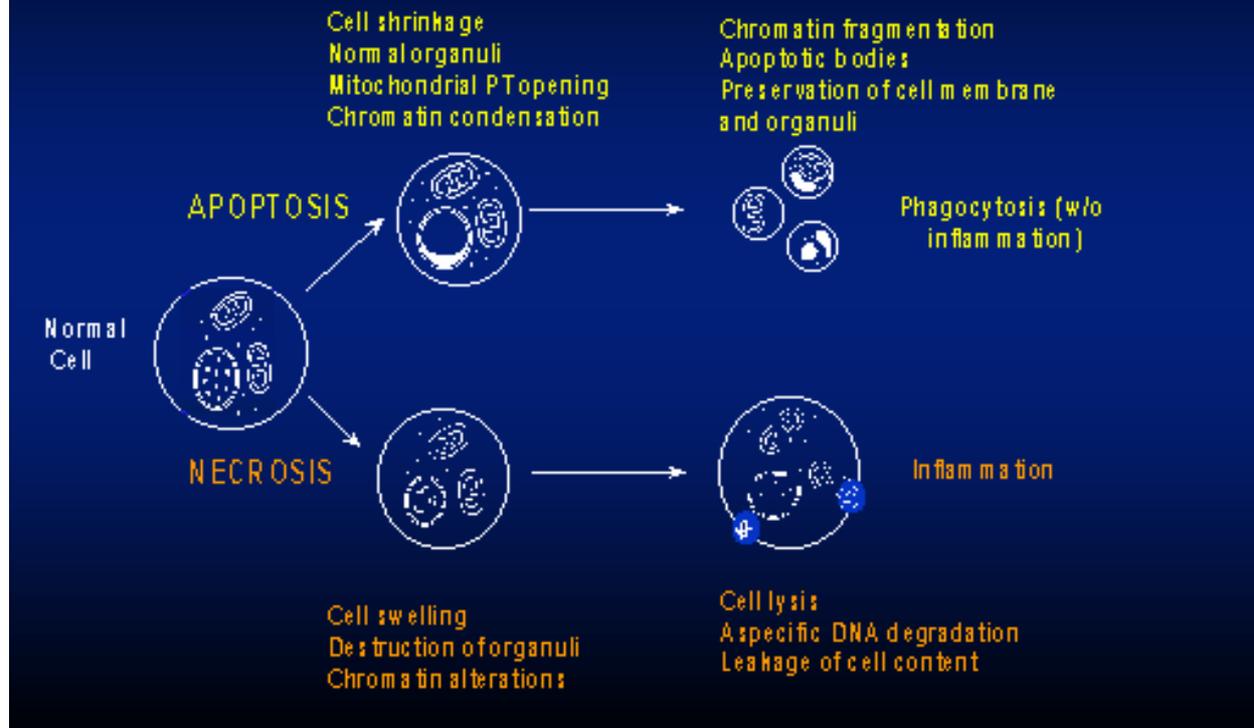
**In collaborazione con il
Dott. ILDO NICOLETTI
Univ. di Perugia**

**a cui vanno i miei più sentiti ringraziamenti per la disponibilità
a mettere in rete la gran parte delle immagini che vedrete
(e la totale ed affettuosa invidia per la sua bravura....)**

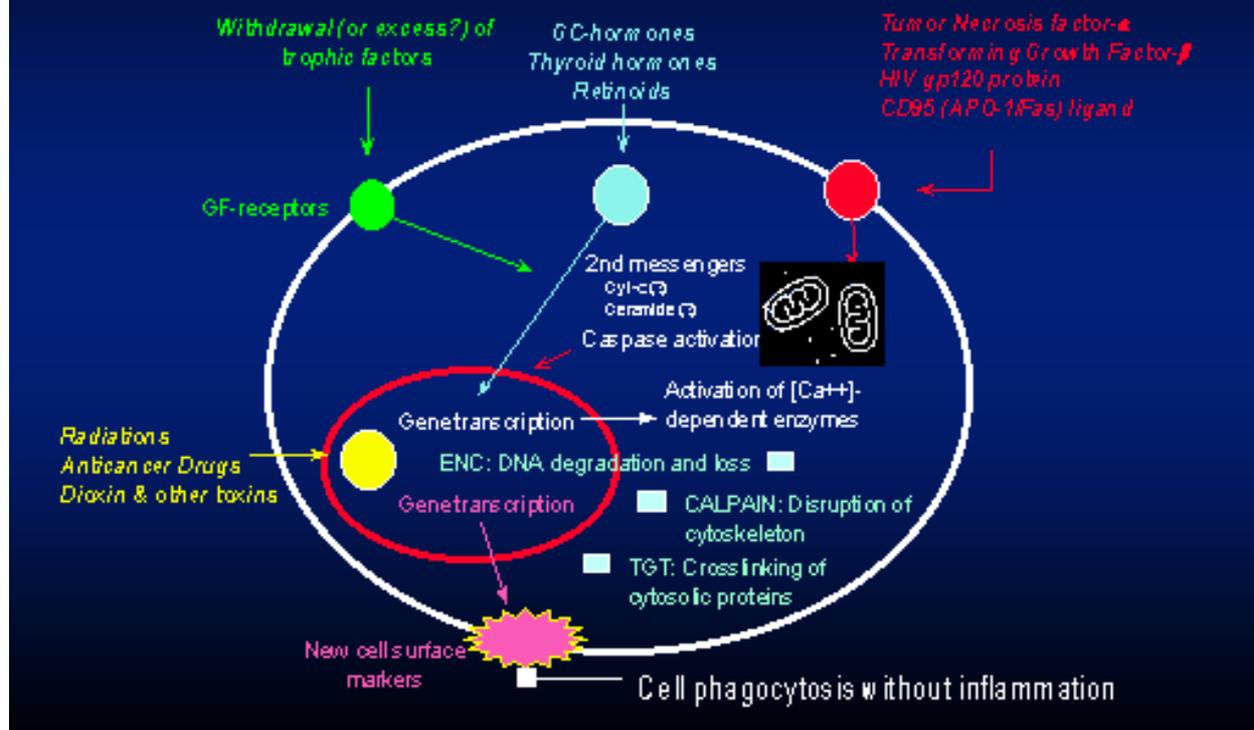
MAIN CHARACTERISTICS OF APOPTOTIC CELL DEATH

- Has specific morphological and biochemical markers
- Is a finely regulated process
- Caspase activation plays a crucial role
- Synthesis of new mRNA and proteins is required (at least in the "true" PCD)
- Nuclear chromatin cleavage by type-1 and type-2 DNAses anticipates cell death
- DNA fragmentation and chromatin condensation are important hallmarks of the apoptotic process

MAIN DIFFERENCES BETWEEN APOPTOSIS and NECROSIS



Common Metabolic Events in Apoptosis



Common Methods for Investigating Apoptosis

- **Morphological**
 - Nuclear shrinkage and 'cell membrane blebs'
 - Chromatin condensation
 - Apoptotic bodies
- **Biochemical**
 - Analysis of caspase activation
 - Measure of mitochondrial activity (cyt-c release, $\downarrow \Psi_m$)
 - Analysis of DNA fragmentation
 - Measure of nuclear DNA content
 - Analysis of membrane lipid ratio
 - Analysis of apoptosis-related antigens
 - Analysis of DNA strand breaks

Analysis of Apoptosis is complex: Why so many Methods?

- Because there are different types of apoptosis
- Because both biochemical and morphological aspects may be different in the various experimental systems
- Because apoptotic cell death is a dynamic process

Different Patterns of Cell Death

Type	Apoptosis			Necrosis
	1	2	3	4
Agents	Antigen GC's Irradiation	TNF- α Fas	CTL	Pore-Forming Molecules (Complement)
Events	Macromolecular Synthesis			
	required	detrimental	neutral	
	DNA Fragmentation			
	classical	classical/high Mw	high Mw	
Time	12-24 h	1-2 h	< 60 min	

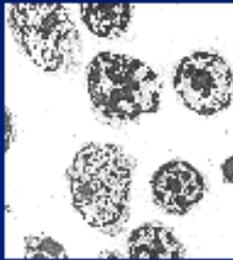
Golstein et al. 1991

Morphological and Flow Cytometric Characteristics of Apoptotic Cells

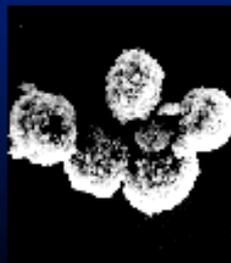
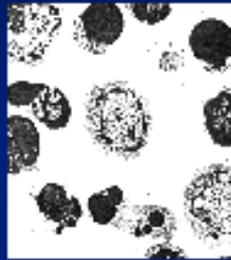
- Reduced cell volume and enhanced chromatin condensation → Alteration in scattering properties (FSC & SSC)
- Reduced DNA content → Hypodiploid DNA peak
- Presence of DNA breaks → DNA labelling by TdT plus FITC-nucleotides
- Increased sensitivity of DNA to denaturation → Increased green/red AO ratio
- Reduced protein content → Reduced SR staining
- Expression of new cytosolic and membrane antigens → Annexin V-FITC staining
→ TTTG staining
- Mitochondrial alterations → Red/Green ratio after JC-1 staining
→ Expression of new antigens (APO2.7 mAb)

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS IN THYMOCYTES

10% FCS



12 h 100 nM DEX



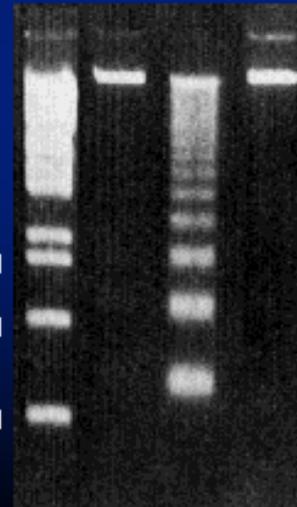
MARKERS

CONT

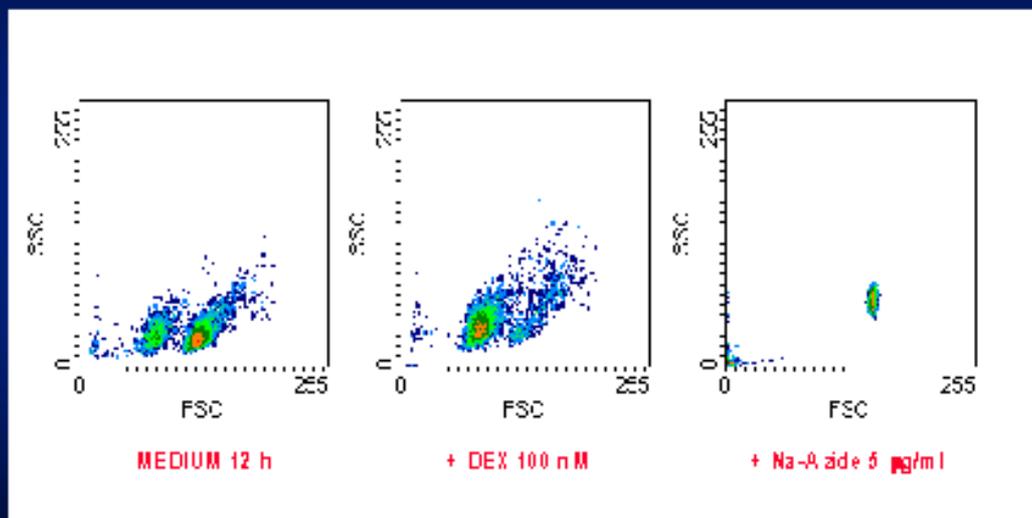
DEX

Na-AZIDE

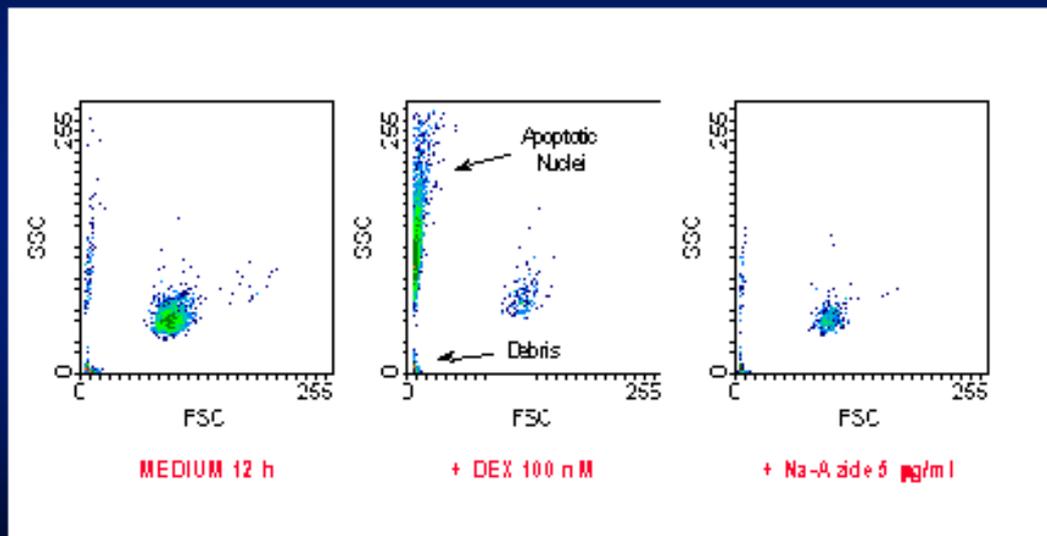
600
300
150



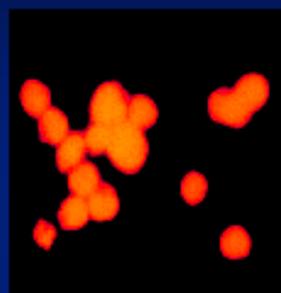
Flow-Cytometric Detection of Apoptosis in Thymocytes: Changes in Physical Parameters after Alcohol Fixation



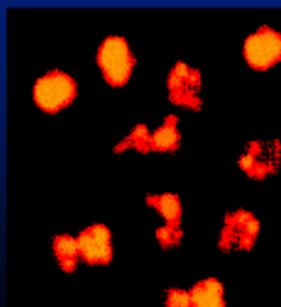
Flow-Cytometric Detection of Apoptosis in Thymocytes: Physical Parameters in Hypotonic Buffer



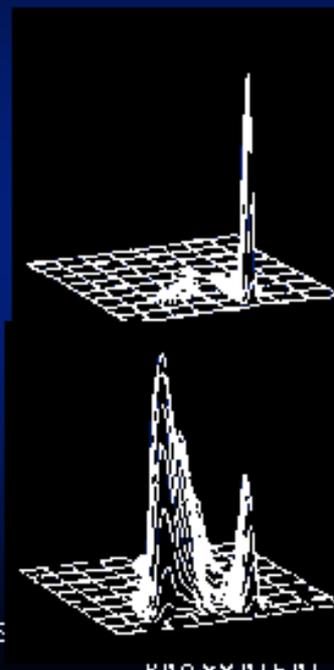
MICROSCOPIC AND FLOW-CYTOMETRIC ASPECTS IN THYMOCYTES



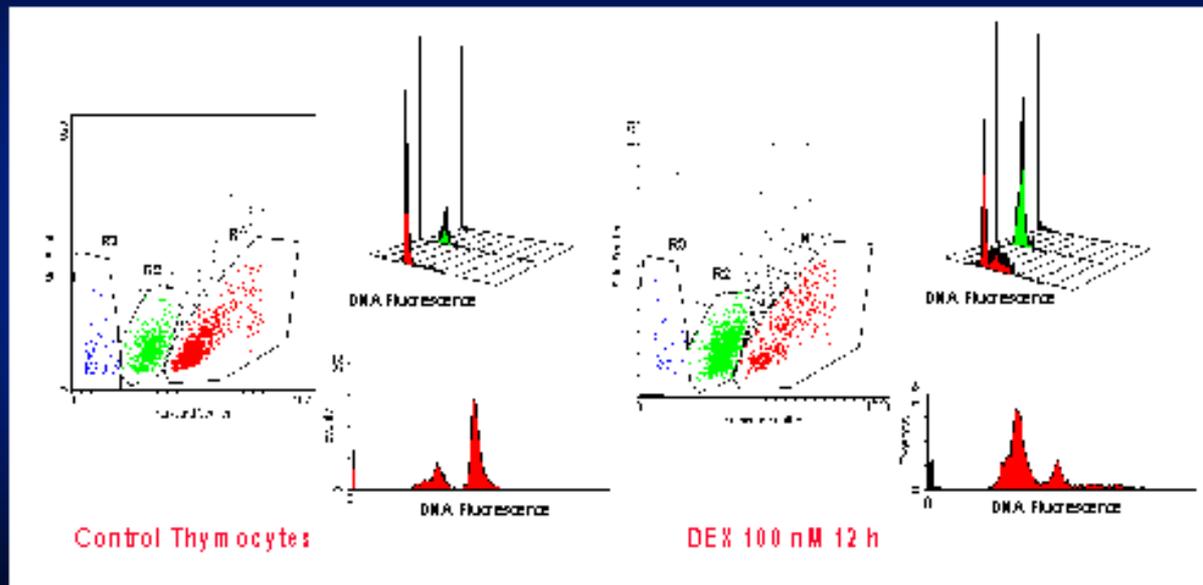
CONTROL



DEX 100 nM



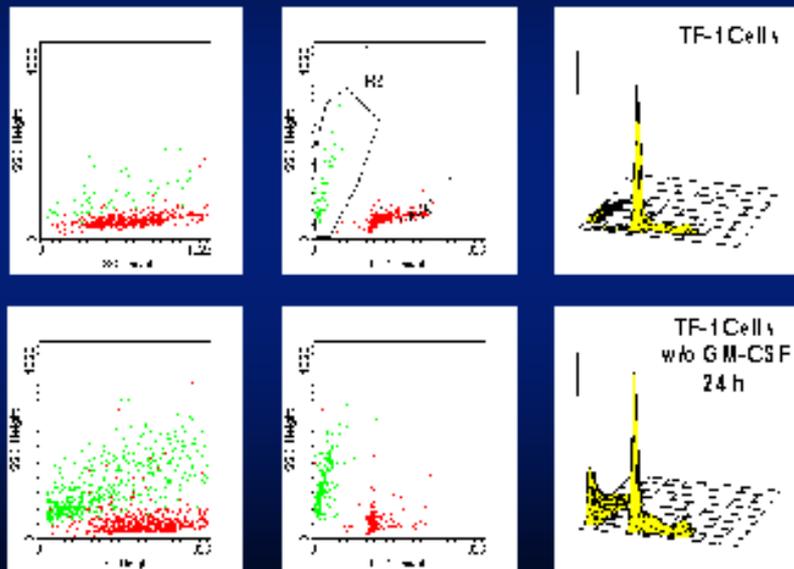
Flow-Cytometric Analysis of Apoptosis in Thymocytes



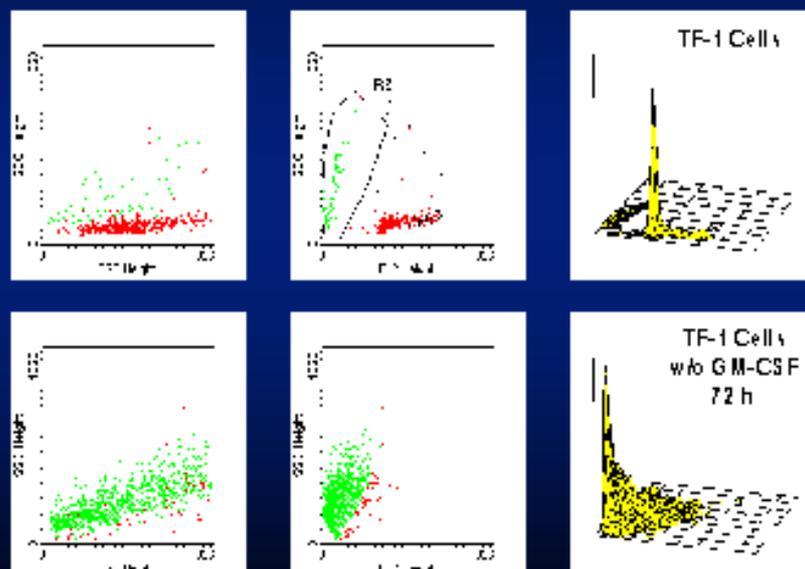
Advantages and Pitfalls of Flow Cytometry DNA Content Analysis in the Evaluation of Apoptosis

- Precise quantification
- Rapidity and reproducibility
- Low cost
- Not useful in all cell models
- Caution with debris
- Caution with necrosis
- Caution with isolated apoptotic bodies
- Caution in adherent cell lines
 - 90% of detached cells are apoptotic
 - 90% of attached cells are normal

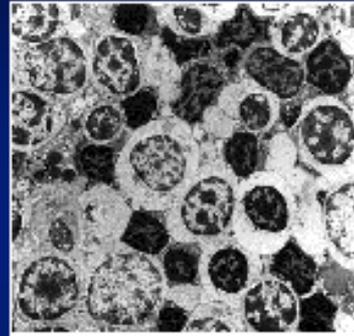
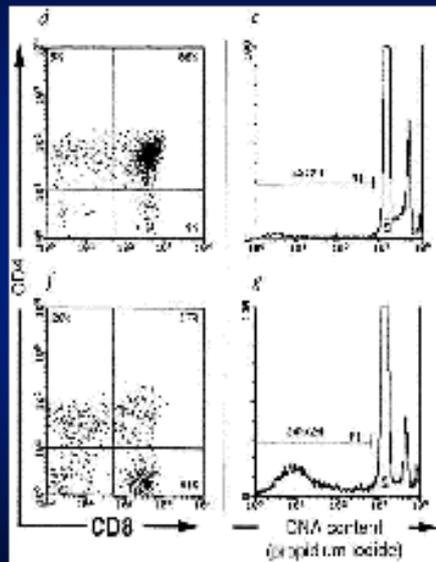
Flow-Cytometric Analysis of Apoptosis in *"in vitro"* Cultured Tumor Cells



Flow-Cytometric Analysis of Apoptosis in *"in vitro"* Cultured Tumor Cells



Quantitative analysis of Apoptosis by PI-staining and Flow-Cytometry

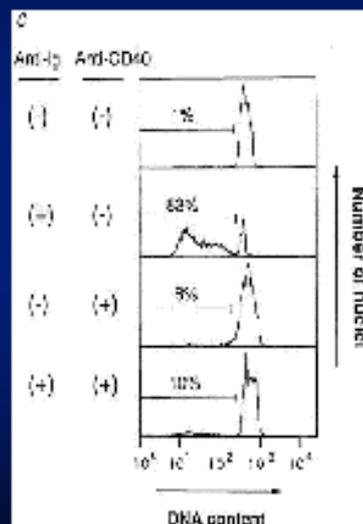


HIV induces thymus depletion *in vivo*

Mark L. Bonyhadi, Linda Rabin, Suzan Salimi, Daniel A. Brown*, Jon Kosek*, Joseph M. McCune, Hide to Kane shima

Nature, 363:728-732, 1993

Hypodiploid DNA peak as a marker for Apoptosis

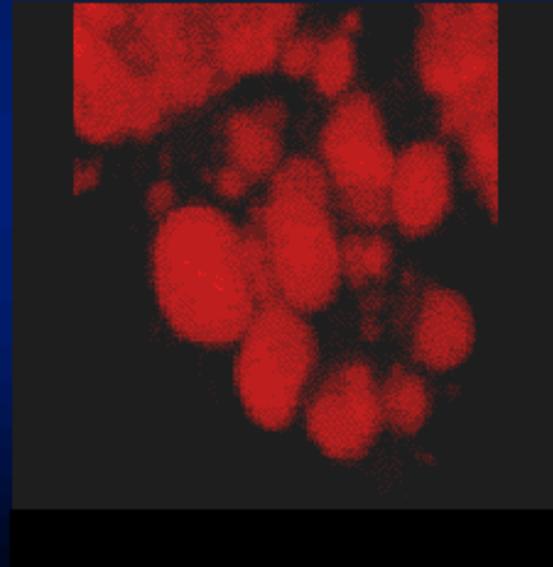
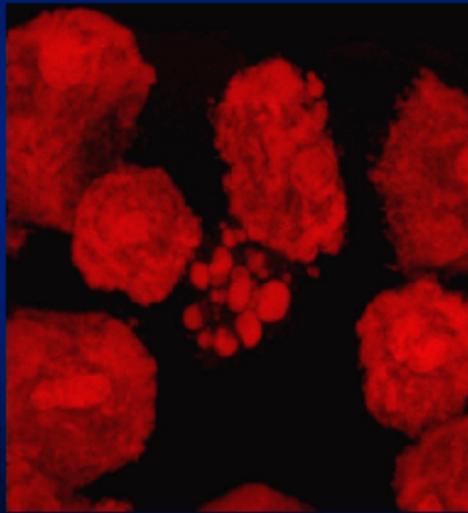


B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40

Take shi Tsubata, Jing Wu, Tasuku Honjo
Department of Medical Chemistry, Kyoto University
Faculty of Medicine, Kyoto 606, Japan

Nature, 364:645-648, 1993

Confocal Microscope Analysis of PI-Stained TF-1 Cells



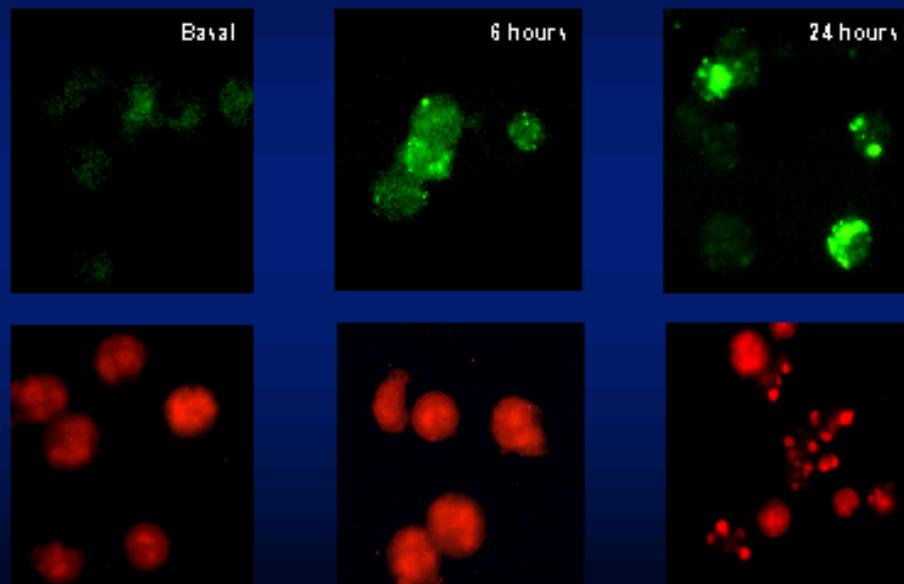
Detection of Apoptosis by TdT-Assay and Flow-Cytometry

Main Steps:

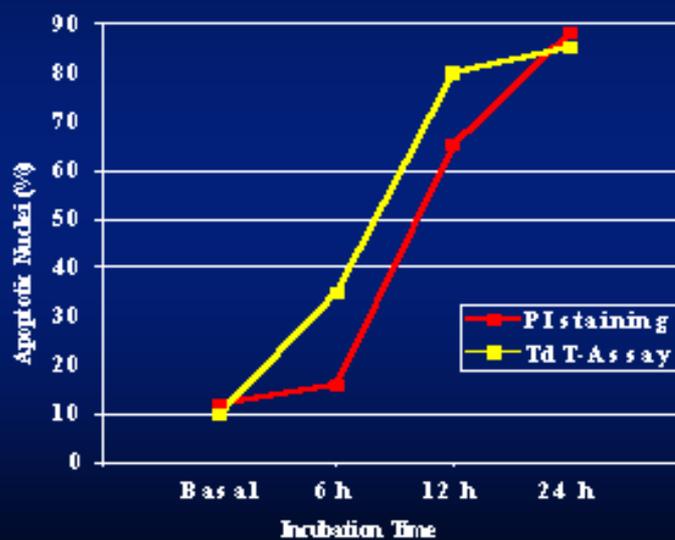
- Fixation in 1% formaldehyde and 70% ice-cold ethanol
- Incubation with biotin-16-dUTP plus exogenous TdT
- Staining of DNA-linked biotin-16-dUTP with FITC-avidin
- Counterstaining with PI
- Biparametric flow cytometric analysis (incorporated dUTP vs DNA fluorescence)

Gorczyca et al. Cancer Res. 53:1946-51, 1993

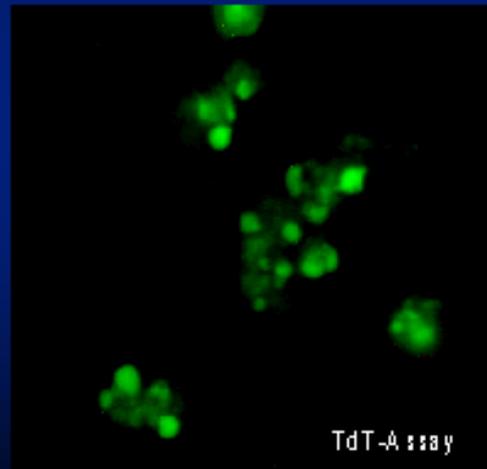
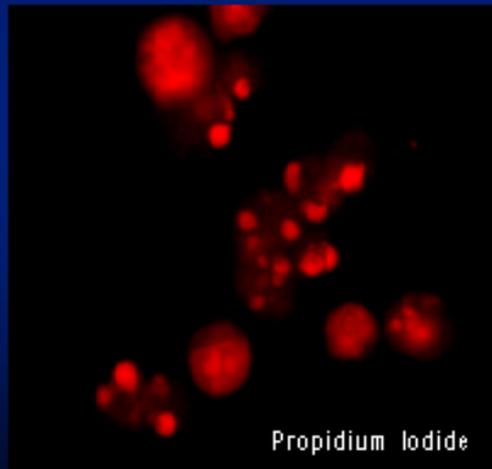
TdT-Assay vs. Propidium Iodide Staining at the Fluorescence Microscopy



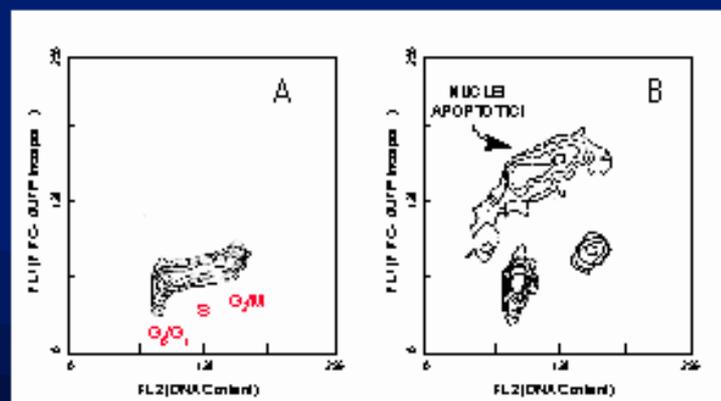
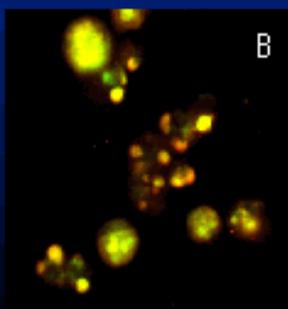
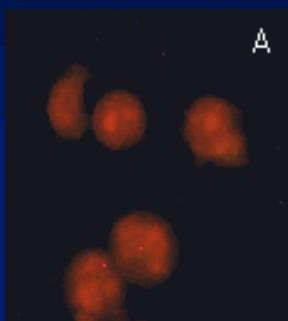
Correlation between PI-Staining and TdT-Assay in the Flow-Cytometric Evaluation of Apoptosis



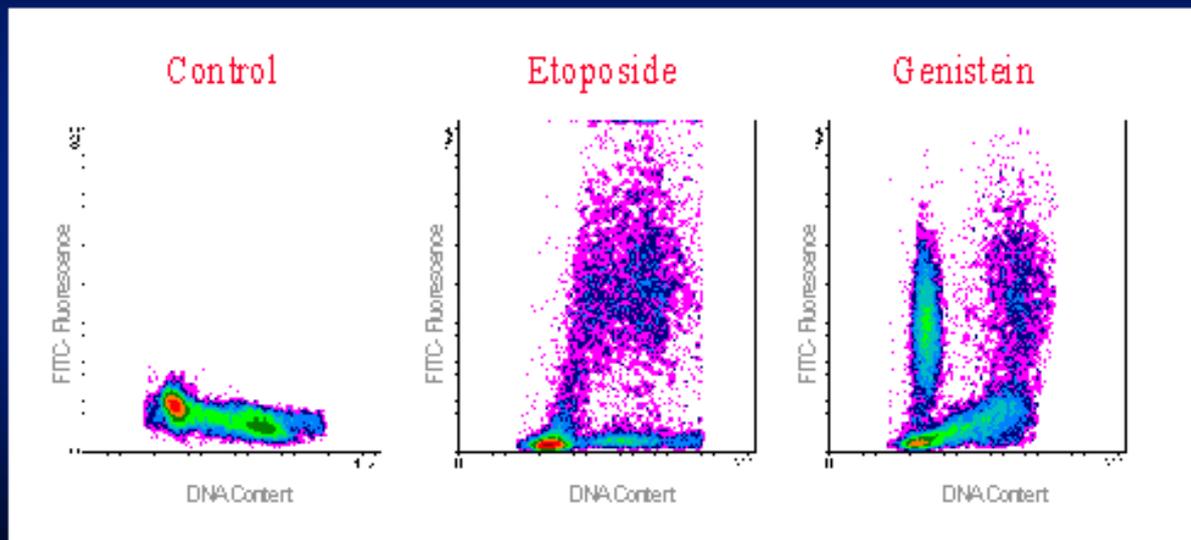
Apoptotic Bodies as Revealed by PI-Staining or TdT-Assay in 3DO Lymphoid Cells



Detection of Apoptosis by TdT-Assay and Flow-Cytometry



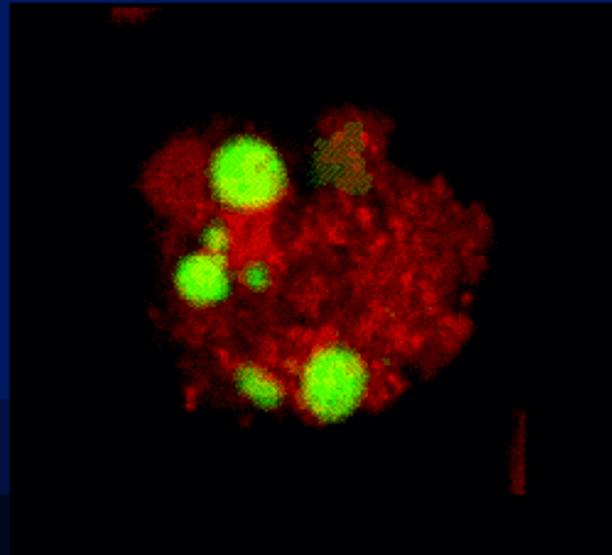
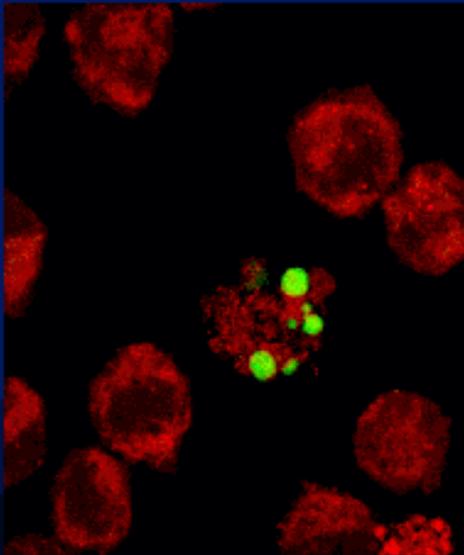
Simultaneous analysis of cell-cycle phases and apoptosis by PI-staining and TdT-Assay



Advantages and Pitfalls of TdT-Assay in the Evaluation of Apoptosis

- Precision
- Specificity
- Relationships between cell-cycle and death
- High cost and complexity
- Caution with debris
- Caution with isolated apoptotic bodies

Confocal Analysis of Apoptotic TF-1 Cells after TdT-Assay



Annexin-V Staining of Apoptotic Cells

Apoptotic cells expose phosphatidylserine (PS) in the outer leaflet of cell membrane. The exposed PS can be revealed by FITC-conjugated Annexin V.

Method:

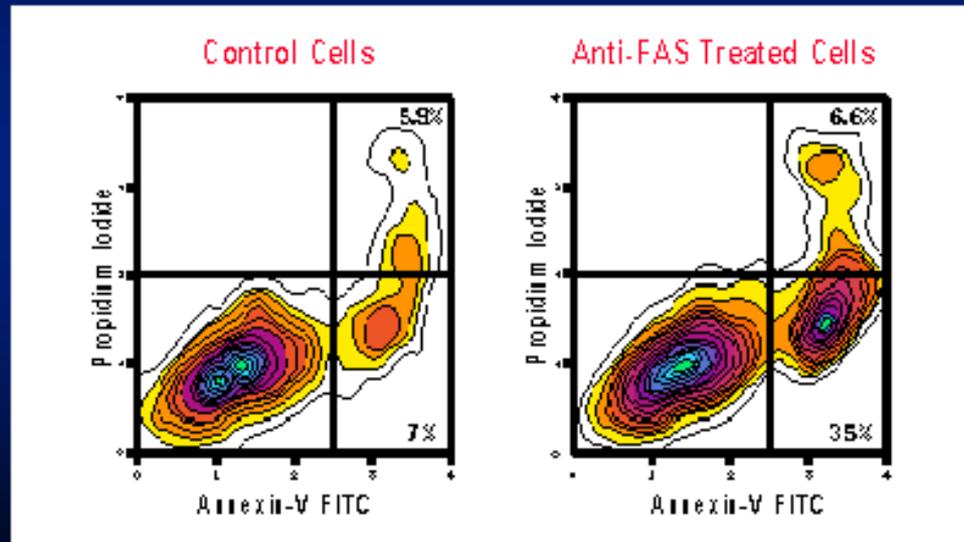
Remove cells from plates, pellet by centrifugation and resuspend in HEPES with 1.8 mM Ca^{++}

Incubate with FITC-Annexin-V (about 0.5 μ g/ml) for 5-10 min

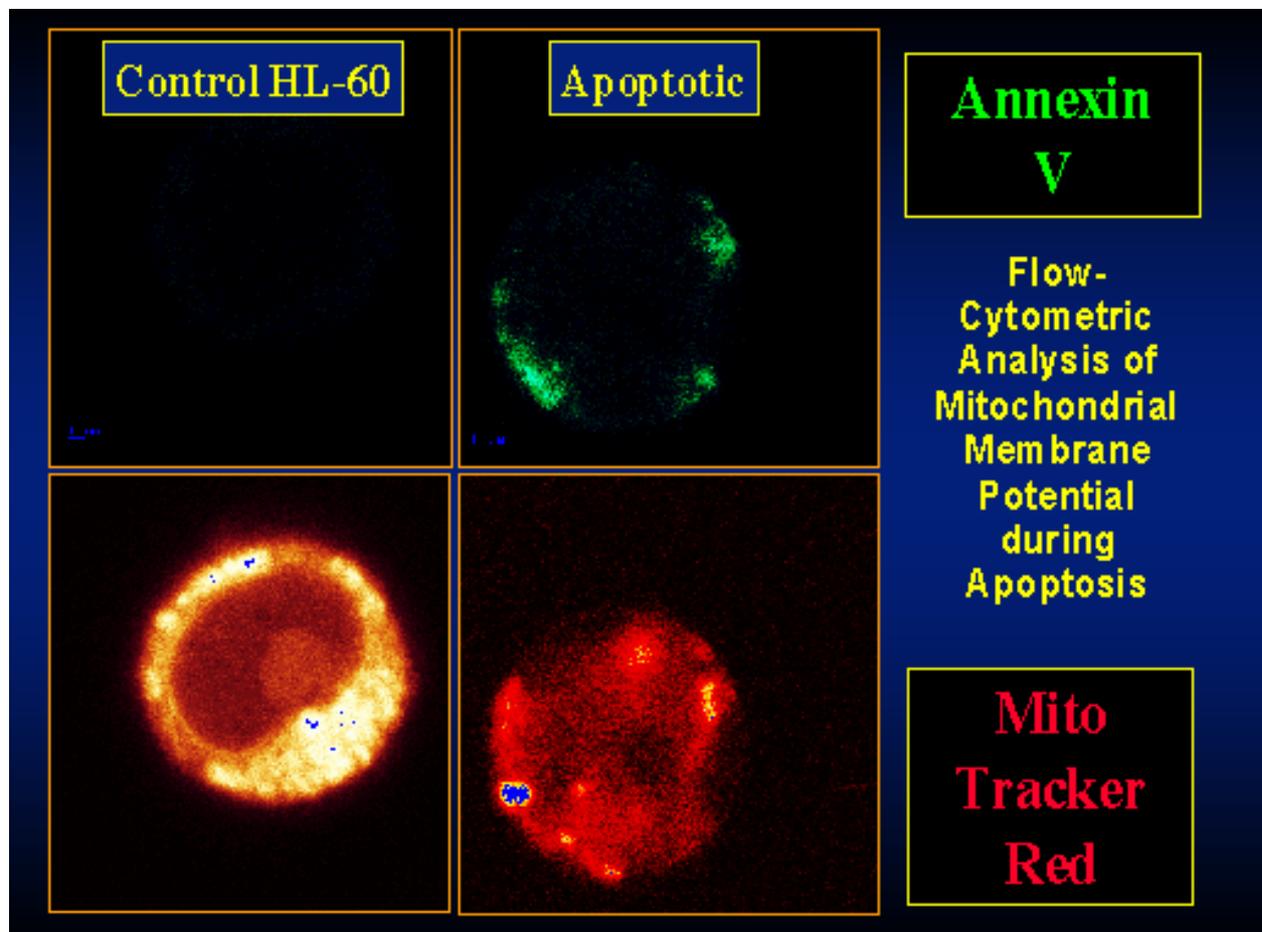
Stain with 10 μ g/ml PI for check membrane integrity

Quantify Annexin-V positive cells by flow cytometry

Flow-Cytometric Analysis of Apoptosis: Annexin-V and Propidium Iodide



courtesy of D. Davies, Imperial Cancer Research Fund

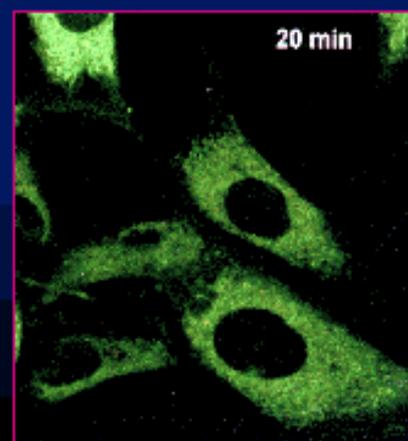
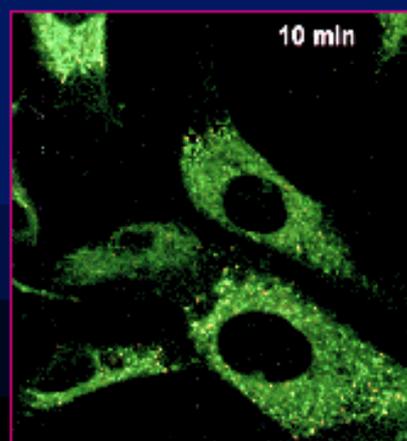
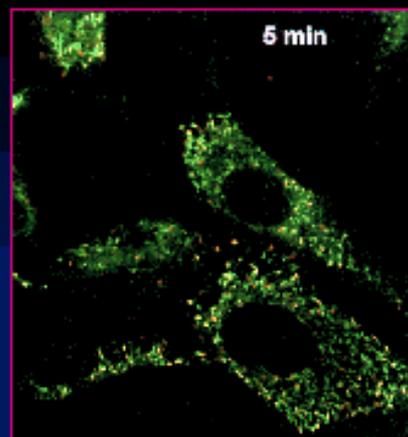
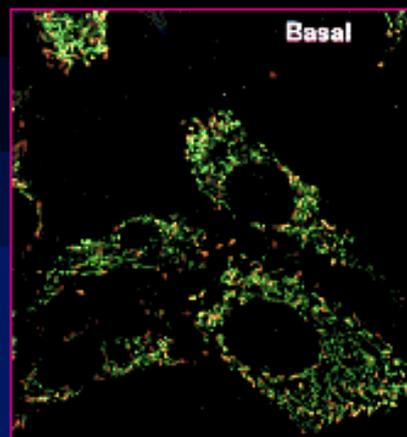


Flow Cytometric Methods for Apoptosis

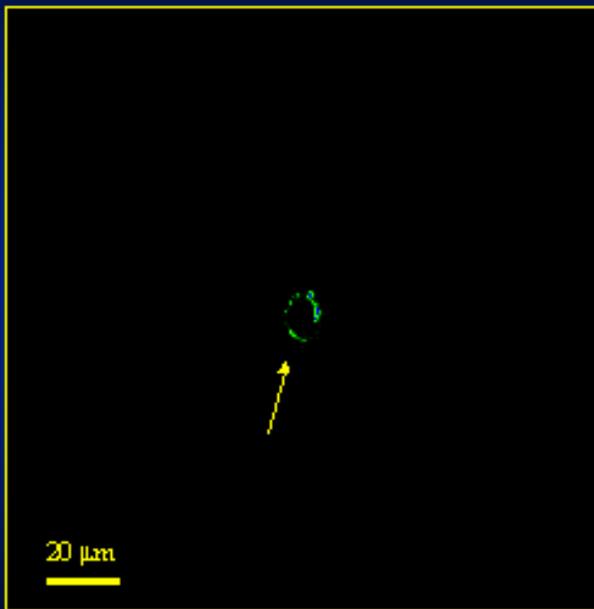
- Flow-cytometric methods represent useful tools for measurement of apoptosis in a number of normal and tumor cells
- Methodological problems due to large debris number, nuclear fragmentation and DNA degradation can occur in a small number of cases
- In these situations classical biochemical methods, fluorescence microscopy observation and/or combination of flow-cytometric techniques (i.e. PI+TdT-A) are required to confirm the presence of apoptosis

Analysis of
mitochondrial
membrane
potential with
the probe JC-1

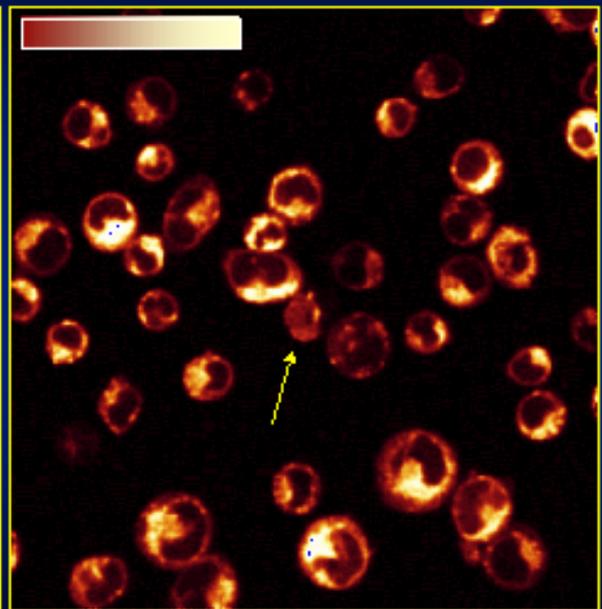
Fibroblasts
treated with
 H_2O_2



Confocal analysis of apoptotic cells: control HL-60 culture

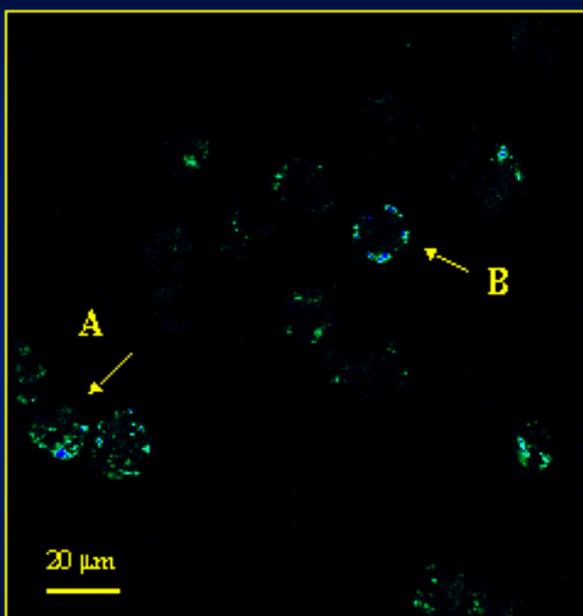


Annexin V

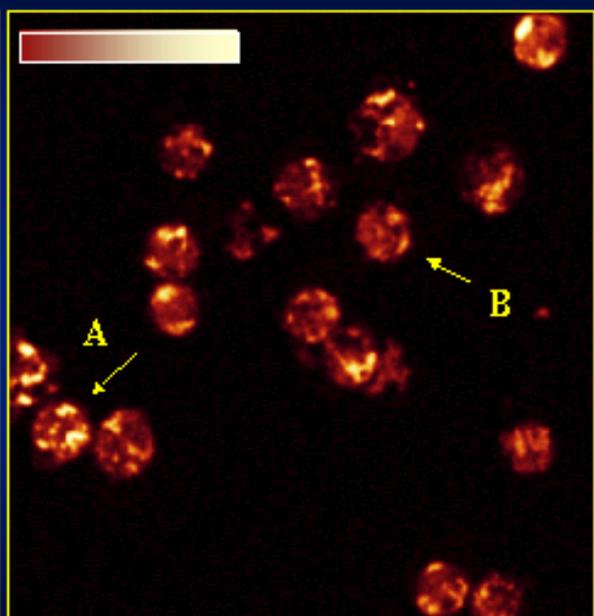


MitoTracker

Confocal analysis of apoptotic cells: staurosporin-treated HL-60 cells



Annexin V



MitoTracker

INTRODUZIONE ALL'IMMUNOPATOLOGIA

Che cosa significa **IMMUNO-PATOLOGIA**? E' una domanda un po' complessa, perché in realtà, fenomeni di tipo immuno-patologico sono abbastanza frequenti, e comunque i meccanismi di tipo "immunopatologico" ricalcano in pieno le reazioni immunitarie normali.. Quindi, immunopatologiche in senso stretto, definiremo quelle reazioni dell'organismo che provocano danni all'organismo stesso, ma che nella maggior parte degli individui non accadono, non perché la maggior parte degli individui non fanno reazioni immuno-patologiche, ma perché le fanno in modo diverso.

Sappiamo che esistono le cosiddette malattie auto-immuni, caratterizzate dal fatto di produrre auto-anticorpi contro componenti dell'organismo. Ci possono essere, però, delle situazioni in cui la produzione di auto-anticorpi (soprattutto non organo specifici) non è legata ad alcun tipo di patologia.

L'altro spettro è quello in cui , una risposta normale contro un antigene, crea dei problemi.

Il sistema immunitario è nato per difendere l'organismo dagli insulti esterni, considerando come insulti esterni principalmente gli agenti infettivi. L'uomo ha messo in atto, nel corso dell'evoluzione, meccanismi che impedissero ai patogeni di compiere il loro mestiere. Allo stesso tempo, però, l'evoluzione del sistema immunitario, ha portato ad una eccessiva complicazione del sistema stesso, tale per cui, alla fine, il fatto di avere più meccanismi (spesso ridondanti) che partecipano all'eliminazione del patogeno può rivoltarsi contro l'organismo. Nelle reazioni immuno-patologiche, dunque, vengono adoperati gli stessi identici meccanismi utilizzati nelle normali risposte immunitarie verso un qualunque patogeno.

Quali sono dunque, i meccanismi che vengono messi in moto?

Ci sono schematicamente 4 tipi di reazioni immuno-patologiche, che possono essere classificate in base al tipo di molecole o cellule coinvolte:

- Vede implicati anticorpi anti-IgE , che vanno a riconoscere antigeni solubili , e che hanno, come meccanismo effettore , l'attivazione di una serie di cellule che sono localizzate in varie parti dell'organismo, e tali cellule sono chiamate **MASTCELLULE**. Tali reazioni di tipo I, portano al legame di una IgE con il proprio recettore posto sulla superficie della mastcellula , e alla degranolazione della mastcellula stessa. (Questa classificazione è sì chiara e utile, ma non bisogna credere che sia tutta così lineare. Le reazioni immuno-patologiche di tipo I, infatti, sono sì le reazioni di tipo allergico, ma in queste reazioni sono coinvolti anche meccanismi che si ritrovano nelle altre classi di immuno-patologie. Allo stesso modo, nelle reazioni appartenenti al secondo tipo, intervengono anche meccanismi caratteristici delle reazioni di classe terza e quarta. Diciamo dunque, che principalmente accade un meccanismo di base, sul quale possono intervenire, altri meccanismi appartenenti alle altre classi di immuno-patologie.).

- Vede implicati anticorpi di classe IgG, che hanno due possibilità:

- a. Legare antigeni presenti sulla superficie cellulare
- b. Legare antigeni della matrice connettivale

In entrambi i casi attivano il complemento, oppure legano, di nuovo, antigeni legati a cellule, facendo però una cosa un po' diversa: se infatti questo antigene che legano è un recettore, essi possono attivarlo, o inibirlo.

- Sono sempre coinvolte le IgG, però in questo caso, l'antigene legato dalle IgG, non è né legato alla superficie di una cellula, né alla matrice connettivale, ma è presente in forma solubile. Tale reazione è dunque caratterizzata dalla formazione di immuno-complessi.

- Tale reazione vede coinvolti i linfociti T, che legano antigeni solubili, attivano i macrofagi, e compiono fenomeni di citotossicità. Queste reazioni di tipo IV, sono poi divise in due sottotipi, e hanno interesse particolare per quanto riguarda i fenomeni di tipo granulomatoso e tubercolinico.

Ripetiamo che nelle risposte auto-immuni risultano implicati gli ultimi tre meccanismi, il II, il III, e il IV; e ripetiamo anche, che, i meccanismi di tipo I sono specifici delle allergie, anche se, come vedremo, nei fenomeni allergici possono essere coinvolti anche altri meccanismi; basti pensare che, comunque, per la produzione di IgE, sono necessari i linfociti T helper che inducono la trasformazione dei linfociti B in plasmacellule secernenti IgE. Questo dimostra come, anche nei processi allergici entri in ballo la componente cellulare di tipo T Helper.

Cominciamo adesso a esaminare una ad una, queste diverse categorie di reazioni, a partire dalle allergie.

L'ALLERGIA

a cura di Giada Zecchi

Quanti di noi sono allergici? Circa 1/4 dei ragazzi del nostro corso, cioè circa il 25 %, sono allergici a qualcosa. Le allergie sono un fenomeno, oggi, largamente diffuso, soprattutto nei paesi civilizzati. In un articolo di Focus, di qualche mese fa, viene attribuita la causa di queste allergie, proprio all'eccessiva civilizzazione, nonché all'inquinamento. Accanto a ciò, però, è probabile anche un'altra cosa: noi oggi abbiamo un sistema immunitario profondamente diverso da quello dei nostri nonni. Noi siamo stati vaccinati verso cose contro cui i nostri nonni non lo sono stati, per il semplice motivo per cui all'epoca non esistevano ancora i vaccini; quindi, ci sono state risparmiate una serie di malattie, e il nostro sistema immunitario, non ha avuto a che fare con certi antigeni. Oggi, noi veniamo vaccinati con una serie di vaccini che il più delle volte sono proteine ricombinanti, o comunque vengono elaborati in vitro, quindi, di un microrganismo intero, noi ne vediamo solo una piccola parte, e facciamo una risposta anticorpale, supponiamo, contro 10 epitopi soltanto, del microrganismo originale. Il problema è che, in questo modo, noi non vediamo tutti gli altri antigeni per i quali il nostro sistema immunitario è stato accecato. Se cioè i miei linfociti T non vengono spinti a riconoscere certi antigeni, hanno un ampio margine, per riconoscerne degli altri. Il sistema immunitario ha sostanzialmente, una soglia costante minima di attivazione, sotto la quale non funziona, e che deve essere il più possibile mantenuta da agenti patogeni. Se noi togliamo una serie di potenziali stimoli, dobbiamo necessariamente TROVARNE degli altri. Questi "altri", non sono altro che agenti, i quali, nella maggior parte della popolazione non inducono alcun danno, mentre in un buon 25% mettono in moto queste risposte allergiche che recano così danno all'organismo.

Questa spiegazione, un po' filosofica, darebbe ragione della preponderante insorgenza delle allergie nel nostro paese, rispetto ai paesi del Terzo Mondo, dove i linfociti T hanno ben altri antigeni a cui pensare che non evocare risposte di tipo allergico.

Nel 1923 Coca e Cooke hanno identificato una serie di patologie, definite **ATOPICHE**, perché colpivano sedi particolari dell'organismo, e in alcuni casi erano perfino senza sede. In seguito furono identificate numerose molecole anticorpali, alle quali furono dati più nomi:

1. Cutesensibilizzanti
2. Omocitotropici
3. Reagine

All'epoca venivano fatti studi abbastanza "sportivi", per capire se tali reazioni erano trasferibili da un individuo all'altro, tramite siero. Un esperimento curioso fu quello fatto da **PRAUSNITZ E KUNSTER**. Prausnitz era allergico al brodo di pesce, e quando assumeva tale brodo, diventava gonfio e rosso. Per capire se questo carattere era un carattere trasferibile, cioè se c'era qualcosa presente nel sangue, che trasferiva la sensibilità al brodo di pesce, si fece un prelievo del siero di Prausnitz, e lo si iniettò a Kunster, per via sottocutanea. In seguito si è somministrato brodo di pesce, anche a Kunster, e, laddove era stato iniettato il siero, si era formato un gonfiore di notevoli dimensioni. Nel siero, dunque, erano presenti sostanze che, trasferite da un soggetto all'altro, trasferivano la sensibilità ad un agente, che, nella maggior parte delle persone non creavano nessun effetto.

Questa è stata la prima dimostrazione del trasferimento delle reazioni allergiche. Si era infatti, capito che nel siero erano presenti molecole solubili, responsabili di reazioni di questo tipo. Oggi queste reazioni di trasferimento da un soggetto all'altro, non sono ritenute eticamente, né legalmente praticabili. Tali sostanze sono state definite CUTESENSIBILIZZANTI, perché IL SIERO INIETTATO SOTTOCUTE A Kunster, aveva provocato la formazione di un ponfo, dovuto all'abbondante presenza di IgE. Poi, sono state definite OMOCITOTROPICHE, perché è stato visto come cellule presenti nel siero, erano in grado di legarsi a cellule dello stesso soggetto, e nel caso in questione le cellule alle quali si legavano erano le mastcellule. Infine, furono dette REAGINE, perché davano una risposta di tipo immediato, molto rapida.

Nel 1966, in Giappone, sono state identificate le cellule responsabili di queste reazioni, ovvero gli anticorpi di tipo IgE; contemporaneamente, le stesse molecole, erano state identificate in Svezia, e definite come Ig-MD. E' rimasto però in uso il primo termine coniato per identificare tali molecole, ovvero, IgE.

Prima di procedere, vediamo però, un'eccezione data dai casi in cui l'elevata concentrazione di IgE nel sangue, non è dovuta a fenomeni di tipo allergico:

- 1. Parassitosi:** Esse sono molto frequenti soprattutto nei bambini. Il fatto che oggi, nel nostro paese, le parassitosi siano molto diminuite, ha portato le IgE a reagire contro altre sostanze, aumentando la probabilità di insorgenza delle allergie.
- 2. Immunodeficienze primitive dei linfociti T:**
 - a. Sindrome di Di George: consiste in un'aplasia congenita del timo; individui affetti da tale aplasia, non hanno il timo, dunque i linfociti T, però fanno anticorpi.
 - b. Sindrome di Bickley
 - c. Sindrome di Wiskott-aldrich
- 3. Infezioni:**
 - a. Sifilide: Alla fine dell'800 era molto diffusa presso la popolazione europea. Con la scoperta della penicillina, il problema di questo agente infettivo è stato risolto, dando però il via all'invasione delle suddette reazioni allergiche.
 - b. Lebbra: Essa oggi, rimane diffusa solo in India
 - c. Mononucleosi: Molto frequente nel nostro paese, soprattutto fra i giovani, e per questo definita "malattia del bacio".
 - d. HIV
- 4. Tumori:**
 - a. Hodgkin
 - b. Sindrome di Sezary: Linfoma cutaneo leucemizzato, in cui è facile trovare iperproduzione di IgE.
- 5. Epatopatie croniche**
- 6. Malattie dermatologiche:**
 - a. Psoriasi
 - b. Penfigoidi
- 7. Malattie auto-immuni:**
 - a. LES: Lupus erimatoso sistemico
 - b. AR: Artrite reumatoide

In tutte queste malattie, sono presenti IgE in circolo, e la cosa curiosa, è che queste IgE, non sono specifiche per alcun tipo di allergene, cioè tali IgE non sono tutte dello stesso tipo, non sono monoclonali, ma sono largamente policlonali, per cui, come vedremo, la probabilità che creino problemi simil-allergici, è assolutamente bassa.

Cominciamo a vedere più da vicino come si scatena un'allergia. Innanzitutto cominciamo a vedere quali sono i protagonisti di questi processi. Sappiamo che esistono delle molecole dette allergeni: per allergene si intende una molecola, che evoca una risposta immunitaria del tutto innocua, nella maggior parte della popolazione. Qualunque molecola, può costituire un allergene: pollini, polvere, acari, graminacee, fragole, pomodori (panna: fa parte del grande capitolo delle pseudo-allergie, ovvero delle intolleranze; tali intolleranze sono dovute alla mancanza di qualche enzima: ci sono infatti, enzimi deputati alla digestione del latte, che, se mancano, bloccano l'assorbimento dell'alimento a livello del galattosio.). Altri possibili allergeni sono stati identificati in alcuni componenti della plastica, o nel talco, o in certi olii.

Per quanto riguarda questi allergeni, ci sono alcune caratteristiche importanti. Noi considereremo gli allergeni di tipo respiratorio, cioè quelli che vengono inalati. Le caratteristiche che dunque, un allergene deve avere sono:

1. Devono essere **PROTEINE**, altrimenti non evocano la risposta mediata dai linfociti B.
2. Devono essere presenti a **BASSE DOSI**, perché antigeni presenti a basse dosi evocano prevalentemente una risposta da parte dei linfociti Th2.
3. Devono avere **BASSO PESO MOLECOLARE**, perché le particelle inalate, devono essere sciolte nel muco, in quanto, se rimangono intrappolate, perché troppo grosse, scapperebbero fuori.
4. Devono essere **SOLUBILI** e facilmente eluibili dal muco in cui si sciolgono, quindi devono facilmente venire a contatto con le cellule che le raccolgono.
5. Devono essere **STABILI**: immaginiamo una pianta che produca una certa sostanza; tale sostanza dovrà transitare nell'aria, 2/3 giorni prima di essere respirata. Durante questo periodo di transito nell'ambiente, dunque, la molecola dovrà mantenere integra la sua struttura, altrimenti perderebbe la sua funzione.
6. Deve contenere **PEPTIDI** che legano soprattutto **MHC di classe II**.

E' stato calcolato che un individuo respira circa 1 $\mu\text{gr}/\text{L}$ di pollini al mese, che nonostante sia una dose bassissima, è quanto basta per creare problemi enormi.

E' stato poi, confermato un legame fra ereditarietà e allergie. A cosa è legato questo fatto? Non è ancora del tutto chiaro, però ci sono particolari associazioni tra alleli HLA, e una risposta di tipo IgE. Cosa significa? Supponiamo che tutti gli individui presenti in aula respirino lo stesso polline: la maggior parte degli individui produrrà IgG, mentre una considerevole minoranza produrrà IgE. Tutto ciò non è legato all'allergene, che dall'individuo normale non è visto come allergene, ma come antigene. Nell'individuo allergico invece, è visto come allergene, e stimola la produzione di IgE. Tutto questo deriva dal fatto che tali individui hanno ereditato aplotipi HLA particolarmente sfavorevoli. Infatti, ci sono alcuni tipi di allergeni, tra cui i pollini, che hanno particolari epitopi, che si legano a particolari aplotipi di HLA. Ciò significa che, individui che hanno, ad esempio, DR2 nel loro HLA, riconoscono un certo antigene presente nel polline che ha un peso molecolare di circa 5.000. Viceversa, coloro che hanno DR5 nel loro HLA, riconoscono un antigene diverso dello stesso polline, ma con un peso molecolare di 11.500. Quindi, possiamo dire, che c'è un'associazione importante tra l'assetto genetico, cioè un determinato aplotipo HLA, e il riconoscimento di un determinato epitopo di un certo antigene, che in questo caso, dunque, si comporta da allergene.

La stessa cosa vale per altre molecole, tra cui il fieno, per cui ci sono epitopi con peso molecolare diverso, in soggetti che hanno un aplotipo caratterizzato da DR3, e che, riconoscendo questi antigeni, danno una risposta mediata da IgE.

Per quanto riguarda gli acari, non è che un individuo è allergico all'acaro, perché le sue dimensioni sarebbero troppo grosse per consentire una risposta immunitaria contro l'acaro stesso; quando però, esso produce escrementi, o si decompone, le particelle che si depositano sul corpo, provocano lo spargimento di questi allergeni.

Vediamo ora, quali sono i principali allergeni responsabili di patologie:

1. Pollini:
 - a. Graminacee
 - b. Orticacee
 - c. Oleacee
 - d. Piante ad alto fusto
2. Acari delle polveri
3. Micofiti
4. Altri inalanti:
 - Derivati epidermici di animali
5. Allergene alimentari:
 - a. Pomodoro
 - b. Uovo
 - c. Proteine del latte
 - d. Nocciola
 - e. Fagiolo
 - f. Pisello
 - g. Merluzzo
 - h. Veleno d'insetti
 - i. Farmaci

Cosa succede nei fenomeni allergici?

1. I° esposizione: Un individuo respira il profumo di un mazzo di fiori, e, clinicamente, non gli accade nulla. Dunque, il primo contatto con l'antigene, non porta ad alcun tipo di sintomatologia.
2. Questo primo contatto con l'antigene provoca una risposta del tutto particolare: gli epitopi dell'allergene, vengono presentati ai linfociti Th2, i quali così stimolati, producono IL-4, che induce lo switch di classe verso le IgE.
3. A questo punto le IgE vanno in circolo, e si legano a specifici recettori che sono presenti in abbondanza sulla superficie delle mastcellule. Esse si legano tramite la loro porzione Fc, in modo tale che il sito di legame per l'antigene rimanga libero. Il risultato finale è dato dalla presenza di mastcellule ripiene di IgE. A questo punto cosa succede? Dal punto di vista clinico nulla; dal punto di vista molecolare, le mastcellule sono "armate", sono cioè, pronte a fare il loro mestiere nel momento in cui il soggetto venga nuovamente a contatto con l'antigene.

4. Il soggetto, dunque, viene nuovamente a contatto con l'antigene.
5. L'antigene, questa volta, si va a legare alle IgE presenti sulla superficie delle mastcellule. L'antigene si deve legare in modo da formare un ponte, che provocherà la degranulazione delle mastcellule. Esiste però una "*conditio sine qua non*", ovvero che le due IgE legate a ponte dall'antigene, siano specifiche per lo stesso antigene. L'antigene, poi, deve essere bivalente, cioè deve avere due punti di ancoraggio, e avrà in questo modo qualche epitopo ripetuto. (questo spiega il concetto introdotto prima sulla policlonalità: se un individuo ha una parassitosi, con molte IgE in circolo, ma tutte diverse l'una dall'altra, tali IgE, si legheranno ugualmente l'una all'altra, però con specificità diverse, cioè una può riconoscere il virus dell'influenza, un'altra il *Clostridium tetani*, ecc.). Una volta che ciò è accaduto, abbiamo la sintomatologia, che è quanto mai varia.

Il problema è : **Dove avviene la reazione?**

L'esito più drammatico è quello che interessa l'anafilassi sistemica: quando vengono degranulate le mastcellule, si ha una serie di eventi legati al contenuto dei granuli, e, più numerose sono le mastcellule, maggiore sarà il numero di granuli liberati. Se il tutto è circoscritto ad un determinato ambiente: naso, faringe, stomaco, intestino, ecc., il fenomeno è in un qualche modo limitato, e la sintomatologia è legata all'ambiente in cui ciò si verifica.

Ad esempio, i pollini sono inalati, e si fermano nelle alte vie respiratorie, grazie alla presenza di ciglia e muco che bloccano il polline nel naso o nelle prime vie aeree. La reazione dunque avviene in loco, perché la produzione delle IgE è avvenuta, forse, anche in altri distretti corporei, però il polline si è arrestato nelle prime vie respiratorie, per i motivi suddetti.

Quindi se abbiamo IgE attaccate alle mastcellule nelle vie respiratorie, quando arriva l'antigene, e si lega ad esse, attiverà la mastcellula che libererà tutti i suoi granuli, e la sintomatologia sarà prevalentemente respiratoria, e si parlerà di **Rinite allergica**. Se il polline riesce a scendere, e va più giù, nei bronchi, si avrà la stessa cosa a livello bronchiale. Anticipiamo che all'interno delle mastcellule non ci sono altro che sostanze vaso-attive, per cui avremo un aumento della permeabilità capillare, e contrazione della muscolatura liscia, con conseguente edema. Qual è il risultato? Sia l'edema che la contrattura della muscolatura liscia inducono occlusione del bronco, per cui l'aria passa difficilmente. Di fatto dunque, avremo una bronco-costrizione, seguita da una iperproduzione di muco. Per quanto riguarda invece, le allergie alimentari, abbiamo già visto come gli alimenti che maggiormente danno allergia sono: latte, uova, fragole, pomodori, ecc., ed essendo la loro entrata principalmente orale, i segni clinici in questo caso saranno vomito, diarrea, prurito e orticaria (tipica dell'allergia alle fragole); quindi anche in questi casi i sintomi sono per lo più localizzati. La cosa più pericolosa accade quando **l'allergene va in circolo**: ad esempio quando si è punti da una vespa, o morsi da un serpente, o si prende un farmaco verso il quale si è allergici, di fatto in tutti questi casi la reazione è sistemica. Il meccanismo è sempre lo stesso, cioè le mastcellule si degranulano e liberano il loro contenuto, però lo fanno dappertutto. La reazione di edema sarà dunque, generalizzata, così come la reazione di vaso-costrizione, e si va incontro a quello che viene definito shock anafilattico, che può essere preceduto da sintomi non troppo piacevoli, come l'edema della glottide, che impedisce il passaggio dell'aria in maniera massiccia; in secondo luogo, fenomeni di tipo vaso-costrittivo in periferia, e soprattutto a livello gastro-enterico, porta ad una massiccia ipovolemia; tale riduzione del volume ematico porta ad un collasso cardio-circolatorio. La fase finale dello shock anafilattico è la morte. Ci sono poi, fenomeni locali legati alla puntura di certi insetti, che rilasciano sostanze tossiche o allergizzanti locali, e allora in questi casi la reazione è locale. I test cutanei fatti per la verifica di eventuali allergie vengono fatti in ambiente "protetto", cioè quando si fanno i test anti-allergici, il pericolo è grosso, perché può accadere che la sostanza iniettata prenda un piccolo capillare, e andare in circolo, provocando così una reazione sistemica. Dunque, tutti i test vengono fatti in presenza di un rianimatore, o con eventuali iniezioni di cortisone o adrenalina pronte in caso di necessità.

A questo punto ci si chiede, perché un individuo produce IgE? I linfociti T CD4, in base alle citochine con cui vengono a contatto, possono diventare Th1, oTh2. Vediamo che se il CD4 diventa un Th1, produce INF- γ , IL-2, e IL-12, importantissima, e fa diventare il linfocito B, un produttore di IgG. Se invece, il linfocito T è un Th2, produrrà IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, ma soprattutto, fa diventare il linfocito B un produttore di IgE.

Una cellula APC, che presenta l'antigene, può presentare indifferentemente una molecola, che definiamo antigene o allergene, a seconda di quella che è la reazione che scatena. Spiegando meglio: la molecola presentata è sempre la stessa, però, se è presentata in un ambiente dove c'è molta IL-12, ovvero dove i linfociti Th0 diventano Th1, allora abbiamo una risposta di tipo IgG. In questo caso, dunque, la molecola presentata è trattata da **ANTIGENE**. Se invece, ciò accade in assenza di IL-12, ma in presenza di IL-4, o IL-13, il linfocito Th0, matura in Th2, produce IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, e il linfocito B avrà un brevissima prima fase in cui produce IgG, e una immediata successiva fase, in cui produce IgE. Quindi, il punto cruciale è nel come l'antigene viene presentato ai CD4, e soprattutto come è il microambiente in cui ciò accade. Se la presentazione avviene dove abbonda IL-12, la risposta dell'organismo è buona, se invece, avviene in un ambiente dove non c'è IL-12, ma IL-4, e IL-13, abbiamo una risposta di tipo IgE, in cui la molecola non viene trattata da antigene, ma da **ALLERGENE**. Sappiamo come la produzione del TNF, e altre citochine, sia geneticamente determinata, cioè, ci sono individui, che semplicemente per il loro assetto genetico, producono più TNF, o meno TNF; è molto probabile che ciò valga anche per citochine come IL-12, e allora, se la mucosa bronchiale, dove avviene l'incontro con l'antigene, produce poca IL-12, o la produce male, per vari motivi che possono essere genetici, infiammatori, o metabolici, è chiaro che si va verso la trasformazione dell'antigene in allergene.

Se invece, la mucosa bronchiale produce molta IL-12, allora abbiamo un CD4 che diventa un Th1, e produce IgG. IL-12 è prodotta dalle cellule della mucosa bronchiale, nonché da fibroblasti, cellule endoteliali, e APC. A questo punto, i fattori che entrano in gioco, sono numerosi, e ad esempio se la APC è una buona produttrice di IL-12 l'individuo è a posto, se invece, non la produce o la produce male, allora l'antigene diventa un allergene. E' chiaro che molte di queste citochine in sede locale sono indotte da una serie di precedenti esperienze immunitarie: per cui ad esempio, una mucosa che ha subito fenomeni infettivi di vario genere, produce meglio IL-12, perché precedentemente, in sede, c'erano stati dei linfociti Th1 che hanno prodotto IL-12, mediando la risposta verso il Th1.

Le IgE normalmente sono presenti in bassissime percentuali nel plasma, meno di 1 $\mu\text{g/ml}$.

Hanno due recettori: un recettore ad alta affinità presente sulle mastcellule e sui basofili, e un recettore a bassa affinità presente sui linfociti B, monociti, piastrine, ecc. Il recettore ad alta affinità è una molecola un po' complessa, formata da quattro catene, una α , una β , e due γ .

La catena alfa ha i soliti domini di tipo immunoglobulinico, con due ponti disolfuro, ed è prevalentemente presente all'esterno della membrana plasmatica, nello spazio extracellulare. Poi c'è la catena beta, che è una catena di raccordo, con quattro porzioni che attraversano la plasmamembrana. Infine, ci sono le due catene gamma, che all'esterno non hanno praticamente

alcun amminoacido, ma che sono molto importanti per la trasduzione del segnale, cioè hanno un ruolo molto importante nel trasferire l'informazione portata dal legame dell'antigene con la catena α . Questo recettore può legare da 10.000, a 40.000 molecole di IgE. Normalmente il legame recettore-ligando è un legame di breve durata, non più di alcune ore; in realtà, nel caso delle IgE esse possono rimanere attaccate al loro recettore dei giorni, o addirittura delle settimane. Questo ovviamente, non è molto positivo, perché rimanendo attaccate così a lungo, l'individuo è maggiormente esposto al rischio di venire a contatto con l'allergene.

Viceversa, il recettore a bassa affinità presente sui linfociti B, monociti, eosinofili, piastrine, e altre cellule, e ha una importanza nettamente minore per quello che riguarda la patogenesi delle allergie.

Come avviene la degranulazione? Vediamo quello che accade nell'immagine della pagina seguente: Abbiamo il recettore per le IgE, che lega le IgE, arriva l'antigene, che si dispone a ponte, fa un cross-linking di due recettori, e induce così la degranulazione delle mastcellule, e questo rappresenta il fenomeno allergico vero e proprio. Oltre a questo però, subentra tutta una serie di meccanismi che mostrano come si può diventare allergici, senza essere allergici: ci sono cioè, dei meccanismi che provocano una sintomatologia identica a quella dell'allergia in ogni punto, tranne in quello più importante, cioè l'agente causale, cioè la degranulazione delle mastcellule, che abbiamo visto avvenire tramite il legame a ponte di due IgE, specifiche per lo stesso antigene, che incontrano e legano l'antigene, ovvero l'allergene. Le mastcellule, però, possono degranularsi anche in altri modo:

1. **Anticorpi anti-IgE:** è chiaro che siamo nel campo delle patologie auto-immuni, in cui si ha la formazione di auto-anticorpi, in particolare di anticorpi **ANTI-ISOTIPO**, o anticorpi **ANTI-IDIOTIPO**, che possono portare a cross-linking dei recettori, ovvero alla degranulazione delle mastcellule. Chiaramente qui, l'allergene non c'è. In questo caso le IgE possono anche non essere specifiche per l'antigene, sono due IgE qualunque che si attaccano ai recettori, e se c'è un auto-anticorpo, anti-isotipo, possiamo avere la degranulazione. Il secondo caso, dell'anticorpo anti-idiotipo, è un po' più complesso perché rientra nei fenomeni di spegnimento della risposta immunitaria. Ovviamente in questo caso le IgE devono essere uguali, però ancora una volta l'allergene non entra in gioco, perché c'è una risposta fisiologica che consiste nello spegnimento della risposta immunitaria.
2. **Cross linking farmacologico:** ci sono farmaci capaci di legare l'Fc dell'IgE, quindi ancora una volta le IgE non sono specifiche per l'antigene, vedono cose completamente diverse, però sono fisicamente attaccate ad un recettore. Se si interpone fra i due recettori un farmaco viene bloccato il cross-linking del recettore stesso.
3. **Produzione di anticorpi anti recettore:** questi anticorpi sono delle IgG che non hanno nulla a che fare con le allergie tipiche, e l'individuo in questo caso non è assolutamente allergico a niente, ma ha semplicemente una patologia autoimmune per cui vengono prodotti auto-anticorpi che riconoscono il recettore per Fc di IgE, cioè Cε.

In tutti questi casi gli allergeni non entrano in ballo, ma si tratta semplicemente di un tipo di risposta o auto-immunitaria, o di regolazione immunitaria, o di presenza di un farmaco inadeguato. La distinzione tra allergia e fenomeno allergico, non è una cosa da poco, perché cambia completamente, il tipo di terapia, e dunque l'approccio con il paziente. E' chiaro che la sintomatologia è uguale, però cambia totalmente la terapia causale: sarà dunque inutile vaccinare un soggetto con questo tipo di patologia, in quanto il problema non è costituito dall'allergene. Tali reazioni dunque, sono chiamate **PSEUDO-ALLERGICHE**: pseudo perché mettono in ballo gli stessi agenti effettori, ma con causalità completamente diversa.

Le mastcellule sono una famiglia estremamente eterogenea, e per questo, ancora molto studiata. Esse contengono numerose molecole come istamina, o derivati dell'acido arachidonico, e presentano una vita media diversa, con un numero di recettori diverso, a seconda del tipo di mastcellula, e dunque del tipo di localizzazione che esse possiedono. Questo è importante perché la probabilità di avere due IgE legate vicine che possono vedere un allergene è molto più alta nelle mastcellule delle mucose, rispetto a quelle del connettivo, in quanto nelle prime troviamo circa 3.000.000.000 di IgE per cellula, contro 300.000 IgE sulle mastcellule del tessuto connettivo. Il fatto dunque, di avere più IgE sulla superficie, implica la possibilità che esse possano più facilmente legare l'allergene. Per quanto riguarda il midollo, sappiamo ancora poco, si conosce comunque che sono presenti mastcellule anche a livello midollare.

Quali sono le molecole coinvolte?

Ci sono diversi mediatori, che costituiscono poi, i responsabili principali delle allergie. Esistono due tipi di mediatori, quelli **preformati**, i più importanti dei quali sono:

- istamina
- serotonina
- eparina
- fattore chemiotattico per i neutrofil

Essi sono preformati, cioè già contenuti all'interno dei granuli, per cui, non appena alla mastcellula arriva l'informazione di rilasciare i granuli, questa butta fuori quello che di pronto ha al suo interno: istamina e serotonina inducono contrazione della muscolatura liscia, aumento della permeabilità vasale, edema e rigonfiamento generalizzato. L'eparina invece, ha azione anti-coagulante, e ciò comporta tutta una serie di corollari.

Ci sono poi le cosiddette sostanze **neofornate** che vengono prodotte nel momento in cui la mastcellula viene attivata. Tali molecole non sono altro che derivati dell'acido arachidonico, tramite la fosfolipasi, ad opera delle fosfolipasi. Tali sostanze mettono in moto due grandi strade che portano, tramite la lipo-ossigenasi alla formazione dei leucotrieni, e tramite la ciclo-ossigenasi, alla formazione delle prostaglandine.

Tutto ciò accade in tempi abbastanza rapidi: subito dopo il cross-linking si ha l'esocitosi che comporta la trasduzione del segnale tramite la fosfolipasi C, produzione di IP3, aumento del Ca intracitoplasmatico, attivazione di proteine e fosfoproteine, e secrezione dei granuli tramite la fosforilazione delle catene leggere della tirosina. Si ha dunque, la liberazione del contenuto di questi granuli, ovvero istamina, serotonina, e eparina. Dall'altra parte, si ha la trasformazione della fosfolipasi, tramite la fosfolipasi, in acido arachidonico, da cui possono ottenersi successivamente: prostaglandine, o leucotrieni che vengono secreti.

C'è un altro gruppo di molecole importanti: **le citochine**, in particolare IL-8, IL-5 e TNF- α . Esse funzionano come chemofattori per neutrofil, eosinofili e basofili, che sono tutti mediatori della risposta infiammatoria. Succede quindi un pasticcio, perché abbiamo il richiamo di neutrofil con l'attivazione di cellule infiammatorie, le quali vengono richiamate nella sede in cui è avvenuto il contatto tra allergene e mastcellule, e non fanno altro che aumentare i problemi locali, che ricordiamo essere caratterizzati da edema, vasocostrizione locale e aumento della permeabilità vasale.

Quindi, vediamo come, al fenomeno allergico, si sovrappone un fenomeno infiammatorio, che non fa altro che amplificare gli effetti che abbiamo appena visto. IL-5 può essere prodotta dai linfociti CD4, e richiama i granulociti. IL-5 fa aumentare la produzione di granulociti a livello staminale, aumenta la loro sopravvivenza, e la loro responsività. Il linfocita CD4 Th2 che tramite IL-4 ha fatto produrre IgE, produce anche IL-5 che richiama neutrofil. Quindi, il CD4 Th2, lavora su due versanti:

1. **Allergico**

2. **Infiammatorio**

Se guardiamo ciò che accade a livello di una sezione bronchiale, in seguito ad un fenomeno allergico, vediamo che c'è un po' di tutto. Guardando quello che è lo schema di una mastcellula che si degranula, vediamo che essa libera istamina, leucotrieni, prostaglandine e PAF, che è il fattore attivante le piastrine, cioè attiva le piastrine e provoca dei microtrombi. Quindi, anche le piastrine giocano un ruolo importante, perché la loro attivazione comporta da un lato, la liberazione di quello che hanno dentro, dall'altro la loro aggregazione in microtrombi. Chiaramente in tutto questo non può mancare l'attivazione del complemento, che di fatto costituisce un altro meccanismo di danno cellulare, nonché di grave infiammazione. Il fatto che i neutrofil vengano attivati in loco, comporta la liberazione di enzimi lisosomiali, e quindi ulteriore danno tessutale, non soltanto localizzato, ma un po' più esteso.

In conclusione , i meccanismi che vengono messi in moto inducono , non solo la degranolazione delle mastcellule, ma anche l'attivazione di un'altra serie di cellule, quali neutrofili, eosinofili, basofili, ecc..

Prima di parlare delle terapie, consideriamo quella che una possibile flow chart per la diagnosi di malattia allergica:

1. Anamnesi: Parlare con il paziente è fondamentale , e una buona anamnesi risolve una percentuale molto elevata di problemi diagnostici; l'anamnesi , ovviamente, deve essere significativa per una qualunque patologia allergica.
2. Prove allergiche cutanee: Si iniettano sottocute una serie di allergeni e compare , generalmente un ponfo in corrispondenza del punto di inoculazione, nel caso in cui il soggetto risulti allergico. Le prove allergiche cutanee sono fatte con tutti i possibili allergeni, e danno due possibilità:
 - a. si forma un ponfo coerente con l'anamnesi, dando così, una diagnosi definitiva.
 - b. le prove sono negative, perciò si passa all'utilizzo di test di secondo impiego.
3. RAST: Sono i cosiddetti test radioimmunologici, che si basano sul dosaggio specifico delle IgE nel siero del paziente. Non si fa altro che prendere dei dischetti di carta molto piccoli, con attaccato l'allergene. Ci si mette sopra il siero del paziente, e se ci sono degli anticorpi specifici, ovviamente , si attaccheranno. Una volta che si sono attaccati, si usa un antisiero anti-IgE, cioè anticorpi anti-IgE, che vengono fatti reagire con il dischetto di carta, ottenendo una reazione di tipo "sandwich". All'anticorpo si lega un enzima in grado di convertire un substrato , che verrà poi fornito, e di portare alla formazione di una colorazione , evidenziando così le IgE attaccate al dischetto di carta. Se invece le IgE non si attaccano, non si osserva nessuna colorazione. In realtà il processo consiste nel mettere in provetta il dischetto di carta con il siero, , si mescola bene, si risospende, si centrifuga per cui il dischetto che è pesante scende, mentre le IgE che sono leggere, non scendono, a meno che non siano legate all'antigene, per cui , in questo caso, il dischetto si porterà dietro le IgE ; poi, si porterà dietro gli anticorpi anti-IgE con l'enzima e quando si mette il colorante avviene la reazione, evidenziando la presenza di IgE specifiche, legate al dischetto di carta.

Tale ricerca di anticorpi specifici, è molto meno fastidiosa delle prove allergiche, ed ha anche il vantaggio di poter essere eseguita, quando le prove allergologiche non possono essere eseguite per vari motivi.

Poiché ciò che interessa è il siero, non si fa altro che fare un prelievo di sangue, , mettere la provetta al caldo, promuovendo la formazione di un coagulo, e si può prelevare il siero, dove sono presenti anticorpi, che sono estremamente stabili, per cui possono essere conservati a temperatura ambiente, o in frigo, per delle settimane. Oltre a questo esistono numerosi altri vantaggi nell'applicazione del RAST:

1. Eliminazione delle cause di falsa positività, e falsa negatività delle prove allergologiche
2. Minor fastidio per i pazienti
3. Buona riproducibilità
4. Valutazione obbiettiva dei risultati
5. Risparmio di tempo nell'esecuzione

Il RAST, però, presenta anche alcuni svantaggi:

1. Numero limitato di allergeni che si possono testare: questo però accadeva 10 anni fa , perché oggi con la tecnologia del DNA ricombinante, vengono prodotti numerosi allergeni.
2. Minor persistenza nel siero , rispetto alla cute, degli anticorpi IgE
3. Impossibilità di rilevare anticorpi omocitotropici di classe IgG
4. Mancanza di un rapporto diretto con il paziente.

Dopo avere applicato il RAST, di nuovo , si presentano due possibilità:

1. Il RAST è compatibile con l'anamnesi, perciò si può fare diagnosi.
2. Il RAST non dà risultati e si ricorre ad altre metodiche dette di “terzo impiego”:
3. Provocazione specifica e liberazione di istamina dai leucociti: la provocazione specifica, spesso, avviene per agenti inalanti , e deve essere eseguita mettendo l'agente laddove provochi dei danni . Tale prova deve essere eseguita in ambiente protetto , per bloccare immediatamente la reazione che l'allergene sta per fare. Il test di liberazione dell'istamina dai leucociti è piuttosto semplice, e si fa in vitro, prendendo i globuli bianchi del soggetto, e osservando quello che succede facendoli venire a contatto con l'allergene.

Una volta che si è capito a che caso il soggetto è allergico, è necessario in qualche modo intervenire. E' chiaro che se il soggetto ha una broncocostrizione, sarà necessario intervenire con la somministrazione di broncodilatatori, che inducano il rilassamento della muscolatura liscia. Esistono poi, farmaci, che sono detti **CROMOGLICANI** che stabilizzano la membrana delle mastcellule impedendo che esse si degranolino. Ci sono poi, farmaci immunosoppressori, come il cortisone, che vengono utilizzati soprattutto nelle reazioni acute.

Lo scopo dell'immunoterapia, almeno nelle reazioni allergiche, dovrebbe essere quello di impedire la produzione di IgE : per fare questo sono state messe a punto vaccinazioni che si basano sulla somministrazione dell'allergene per una via diversa da quella attraverso cui solitamente entra nell'organismo del soggetto allergico. Uno dei problemi cruciali, forse la causa principale della produzione di IgE , è il fatto che le cellule che presentano l'antigene nella mucosa bronchiale, producono poca IL-12, e molta IL-4, indirizzando la risposta immunitaria, verso il settore dei linfociti CD4 TH2 , che fanno produrre IgE, ai linfociti B. E' stato dimostrato come all'aumento degli inquinanti di tipo benzoico , corrisponda un aumento delle patologie allergiche, soprattutto delle alte vie respiratorie. Il problema, dunque, è che l'antigene viene incontrato in un ambiente che è povero di IL-12, e ricco di IL-4, , inducendo così i linfociti T CD4+ a diventare TH2: per evitare tutto ciò sarebbe bene avere delle molecole che bloccano l'allergene prima che vada a legarsi alle IgE. Dato per scontato che non è possibile lavorare in maniera preventiva , quello che si può fare è cercare di impedire che gli allergeni funzionino, e per fare ciò si è tentato di somministrare l'allergene ad esempio per via intramuscolare. In questo modo, l'antigene viene portato al linfonodo regionale, dove viene preso da APC, che producono molta IL-12, che favorisce lo sviluppo di TH1, che a loro volta fanno maturare il linfocito B a plasmacellula secernente IgG . Tali IgG, però , non sempre sono in grado di arrivare alla mucosa bronchiale, prima che l'allergene si leghi all'IgE, quindi, queste terapie possono richiedere molto tempo, e a volte , possono anche risultare inefficaci.

Proprio per il fatto che in molti casi la vaccinazione non funziona, si stanno studiando altre strategie, che permetteranno di produrre IgA a livello locale, ma attualmente non ci sono sperimentazioni sull'uomo. Tali vaccinazioni sono dette **VACCINAZIONI A DNA**, e prevedono l'utilizzo di DNA circolarizzato, quindi in forma non integrabile dal genoma; esso viene sparato dentro alle cellule muscolari dell'individuo: il DNA codifica per una proteina che viene vista dal sistema immunitario come una proteina non self, ed endogena, per cui presentata su MHC di classe I°, a quale classe I°, ha la proprietà di attivare i linfociti TH1. Il vantaggio è molto elevato perché il sistema immunitario produce linfociti CD8+ , ma soprattutto produce anticorpi IgG, e IgA .

**Le basi immunologiche
dell'ALLERGIA
e dell'ASMA BRONCHIALE**



Andrea Cossarizza

Date importanti :

1923:

Coca & Cooke

Malattie Atopiche

1966:

Ishizaka → IgE

Johansson & Bennich → IgND

Caratteristiche dell'Allergene inalato

- *proteina* → solo le proteine inducono risposta T
- *bassa dose* → favorita attiv. CD4 che producono IL-4
- *basso P.M.* → diffonde dalle particelle nel muco
- *alta solubilità* → rapidamente eluito
- *stabilità* → sopravvive nelle particelle essiccate
- *contiene peptidi che legano MHC classe II* → fondamentale per il priming dei linfociti T

... fino a 1 µg/anno

Fenomeni coinvolti

NELL'INSORGENZA E NELLA SINTOMATOLOGIA
DELL'ALLERGIA E DELL'ASMA BRONCHIALE

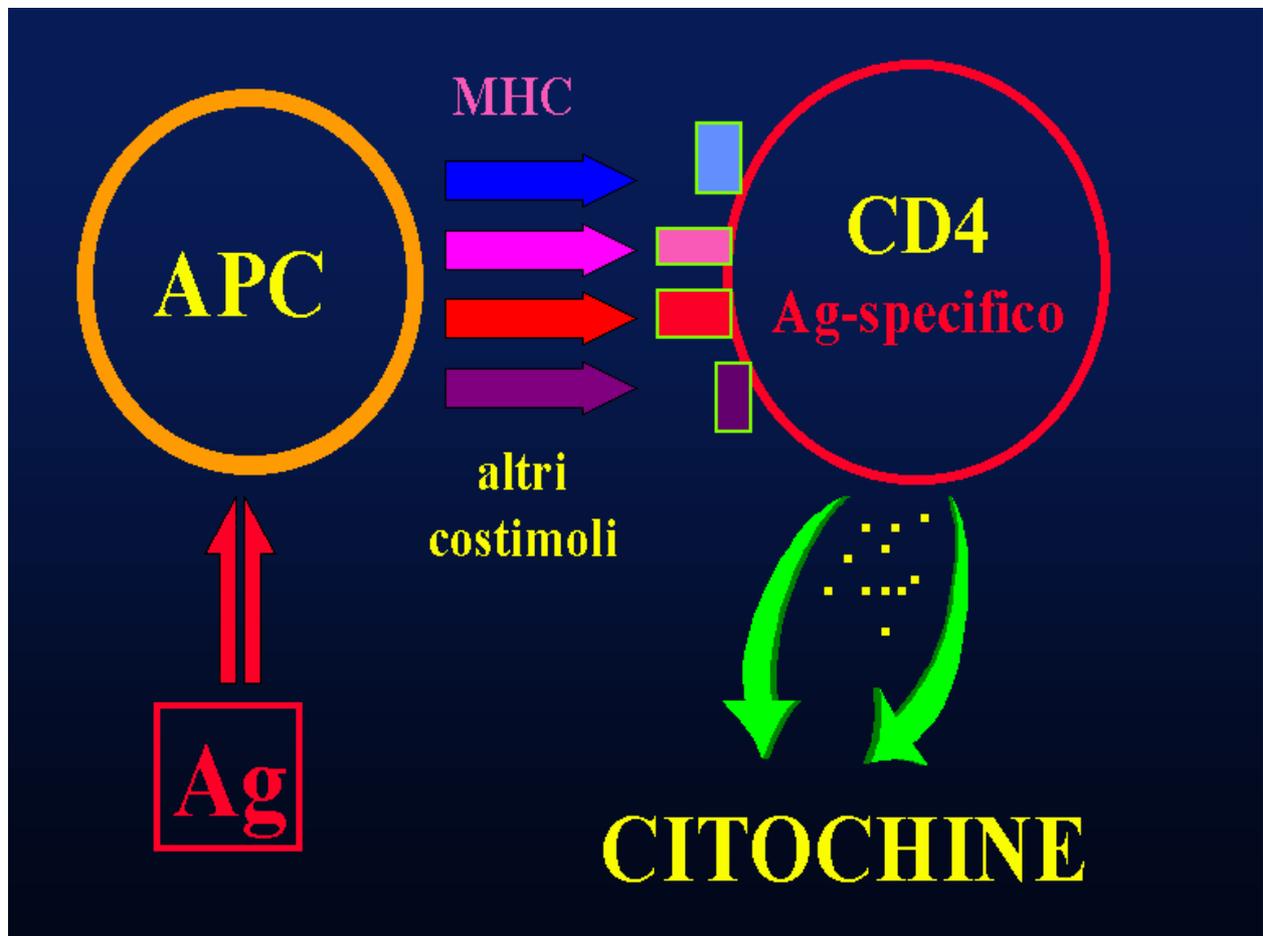
Presentazione dell'Ag

Produzione di IgE

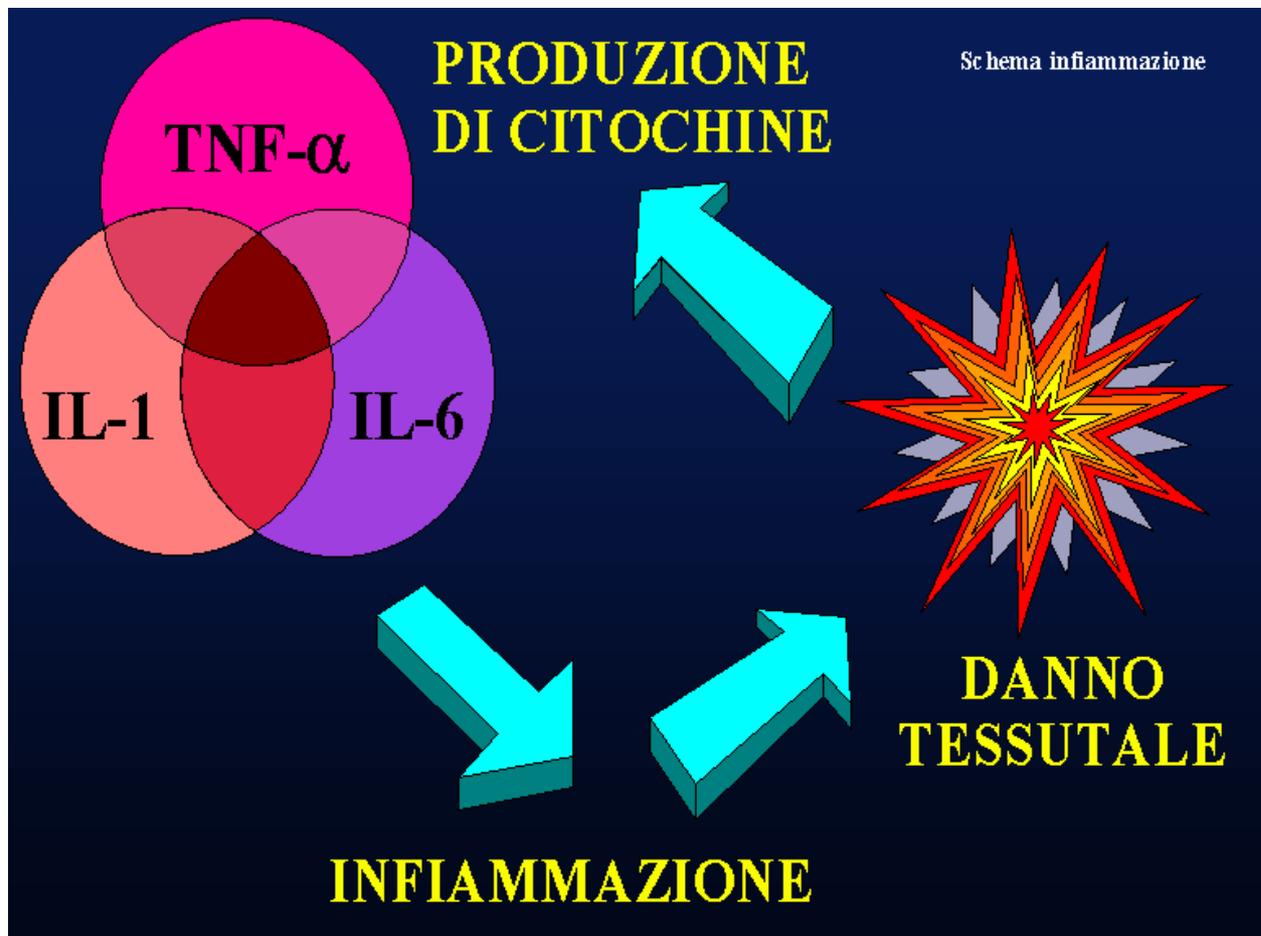
Attivazione delle mastcellule

Rilascio di mediatori pre- e neo-formati

Effetti clinici



**Ruolo dei linfociti CD4
NELLA PATOGENESI
DELL'ASMA BRONCHIALE:
SECREZIONE LOCALE DI
CITOCHINE
PROINFIAMMATORIE**



Ruolo della IL-5

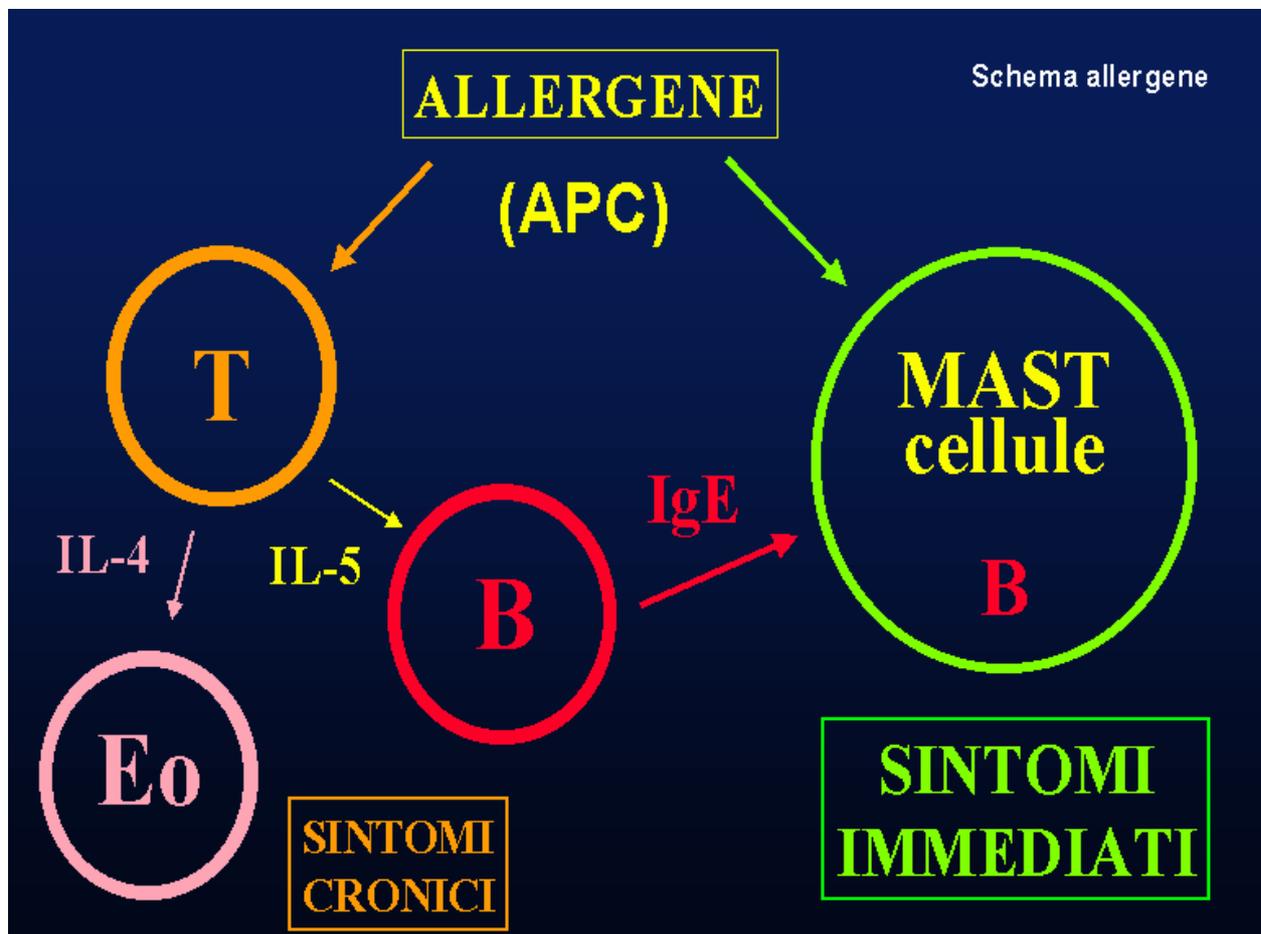
I linfociti CD4 possono rispondere direttamente all'antigene e, tramite la produzione di citochine quali la

IL-5

permettere l'accumulo di granulociti con un meccanismo indipendente dalla presenza di IgE

Interleuchina-5

- ➔ Aumento della produzione di **granulociti** da cellule staminali sia nel midollo che nella sede di infiammazione
- ➔ Aumento della sopravvivenza dei **granulociti** e conseguente accumulo nelle sedi di infiammazione
- ➔ **Effetti** chemiotattici
- ➔ Aumento della **responsività** dei **granulociti**
- ➔ Attivazione dei **linfociti B** e scelta della classe degli anticorpi prodotti



**CONTRAZIONE DELLA
MUSCOLATURA LISCIA**



SINTOMATOLOGIA ACUTA

INFIAMMAZIONE



SINTOMATOLOGIA CRONICA

RUOLO DELLA APC NELLA MUCOSA RESPIRATORIA

- simile alla cellula di Langerhans
- non produce IL-12

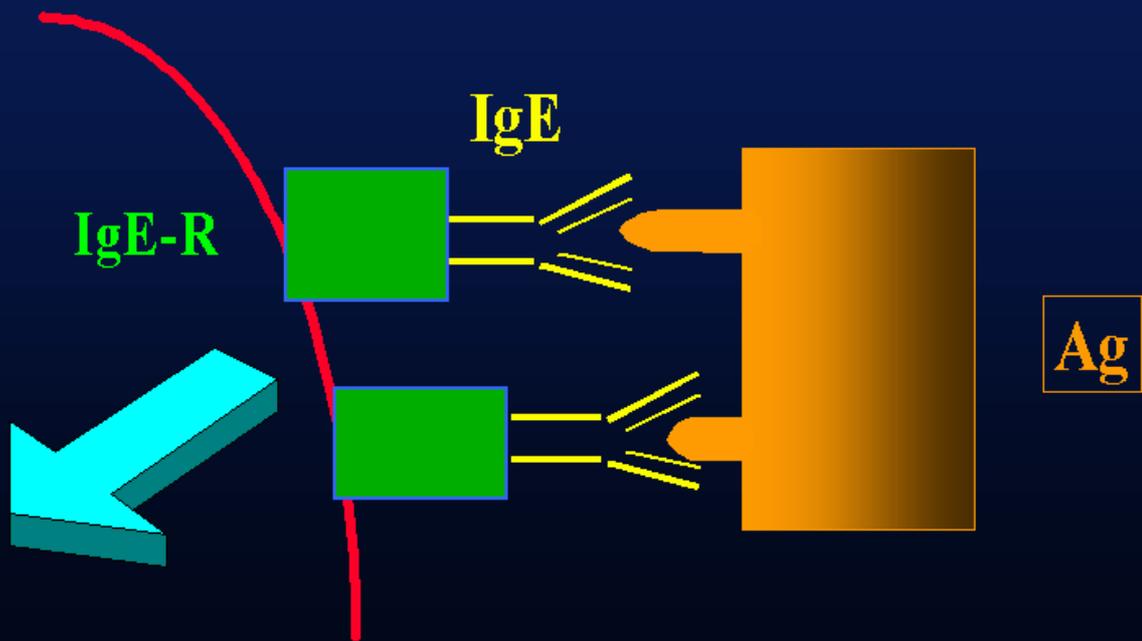


FAVORISCE LA RISPOSTA TH2

Biopsia della mucosa bronchiale nell'infiammazione asmatica:

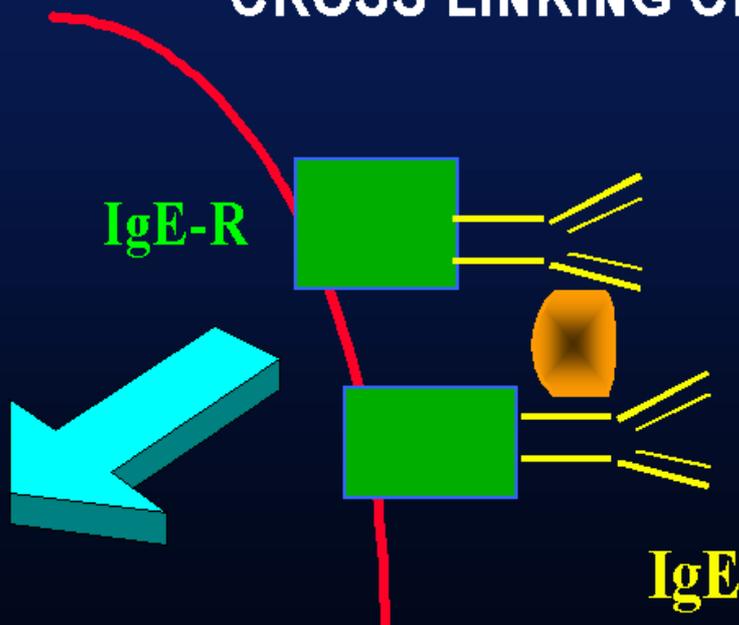
- ➔ **infiltrato con linfociti, eosinofili, neutrofil**
- ➔ **CD4 > CD8**
- ➔ **alto numero di cellule attivate, che correla con
la gravità della malattia e cala dopo terapia**
- ➔ **↑ CD4 attivati nel BAL**
- ➔ **↓ CD4 attivati nel sangue periferico**

**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:
CROSS LINKING DEI RECETTORI**

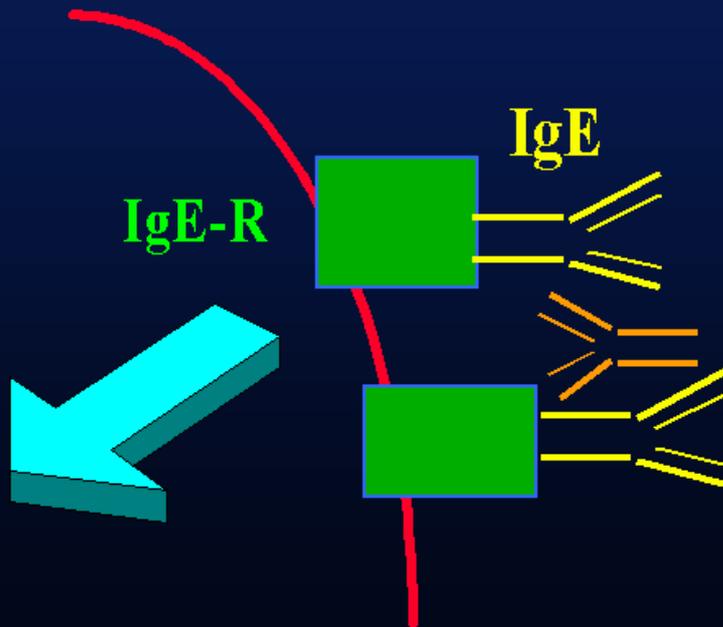


**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:**

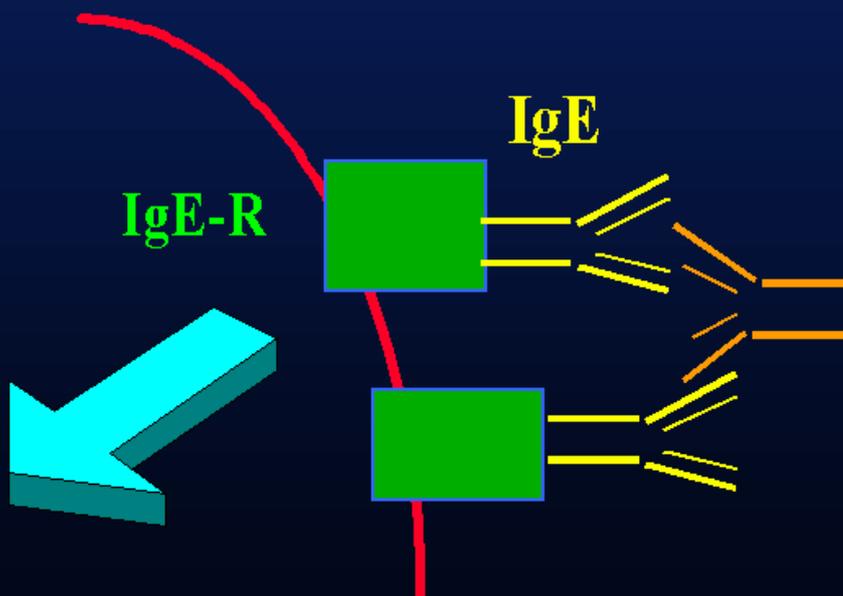
CROSS LINKING CHIMICO



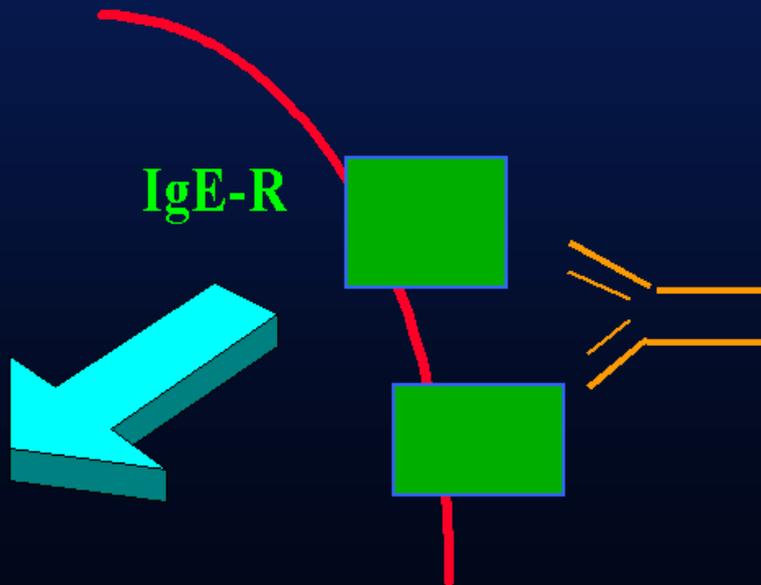
**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:
Ac anti-ISOTIPO**



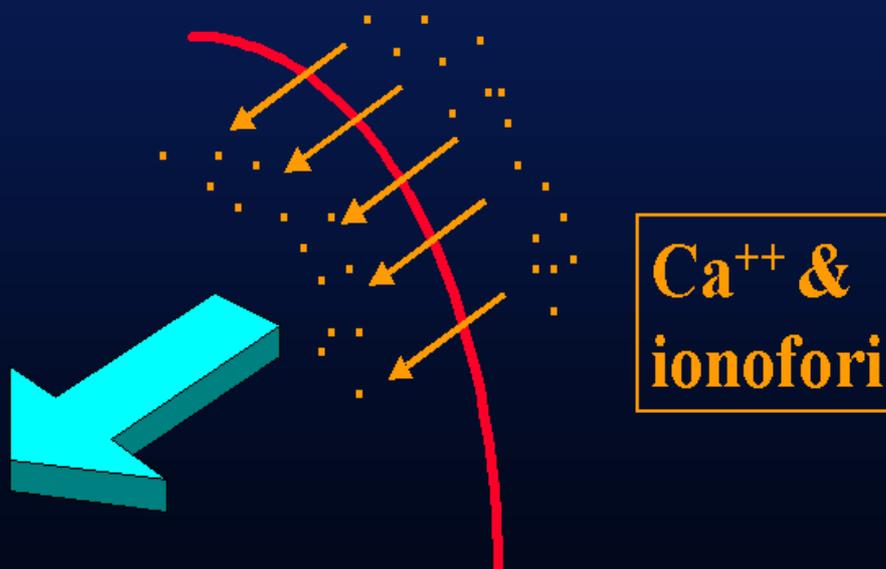
**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:
Ac anti-IDIOTIPO**



**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:
Ac anti-Recettore**



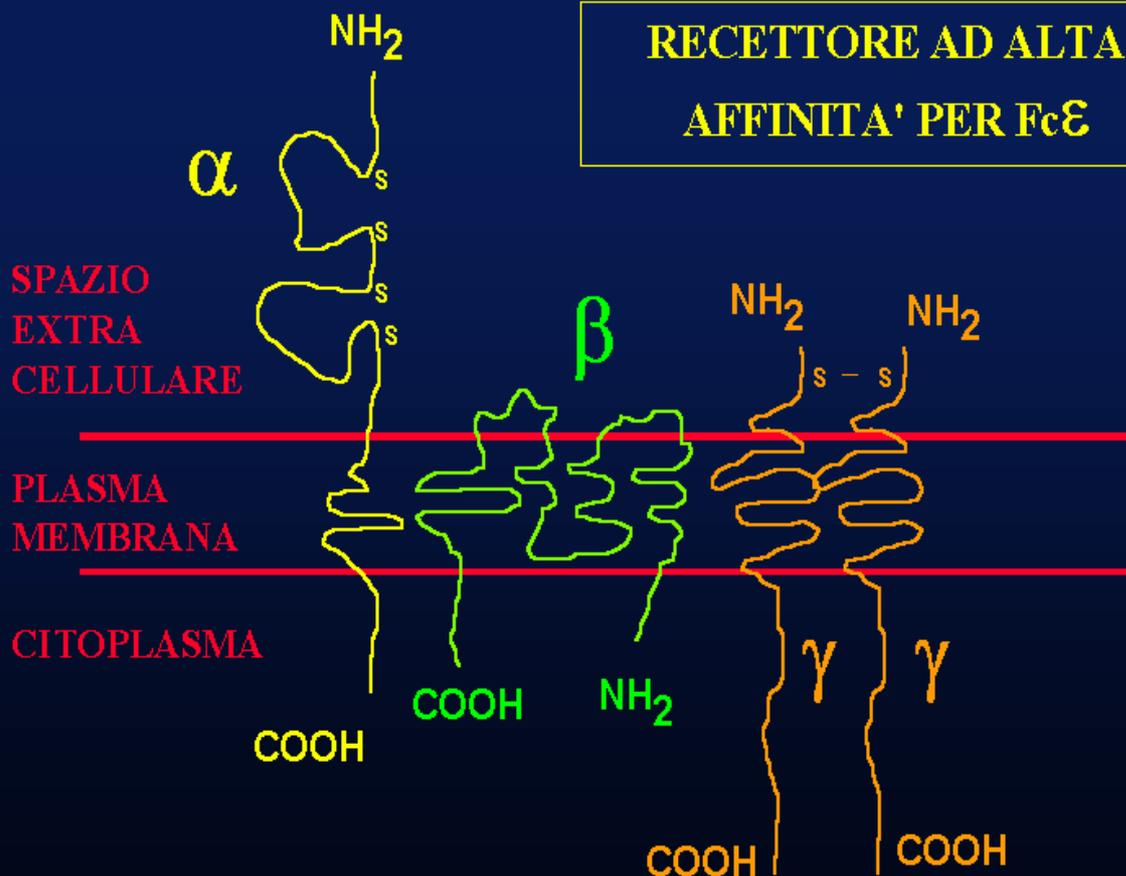
**Attivazione dei meccanismi di degranulazione di
una MASTCELLULA:
Flussi di Calcio**



Eterogeneità delle mastcellule

	CONNETTIVO	MUCOSA	MIDOLLO
DIPENDENZA DA LINFOCITI T	NO	SI	SI
CONTENUTO DI ISTAMINA	ALTO	BASSO	BASSO
PROTEOGLICANO >	EPARINA	CONDROITIN-SOLFATO	
> METABOLITA AC. ARACHIDONICO	PGD2	LTC4>PGD2	LTC4=PGD2
VITA MEDIA	> 40 gg	< 40 gg	?
N. RECETTORI	≈ 3 x 10 ⁴	≈ 2.5 x 10 ⁶	?

RECETTORE AD ALTA AFFINITA' PER Fcε



Recettore per Fcε

- tipo 1: ALTA AFFINITA'
- MASTCELLULE, BASOFILI
- 10.000 - 40.000 MOLECOLE IgE

- tipo 2: BASSA AFFINITA'
- LINFOCITI B, MONOCITI
- EOSINOFILI, PIASTRINE

MEDIATORI PREFORMATI NEOFORMATI

Chemoattrattori



Mediatori

PREFORMATI **NEOFORMATI**

Attivatori



Mediatori

PREFORMATI

NEOFORMATI

Spasmogeni

Istamina

PDGF2

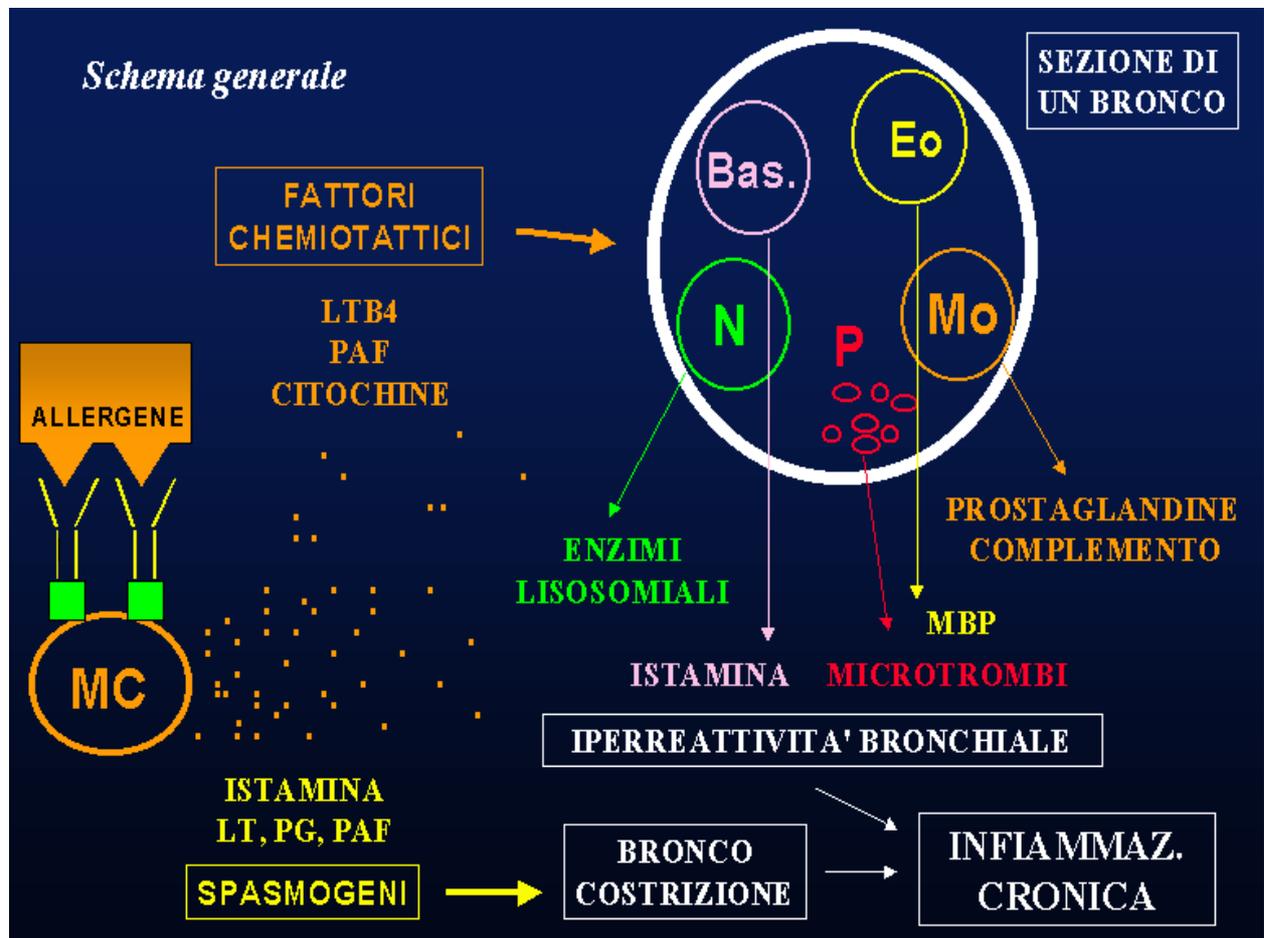
LTC4, LTD4



contrazione muscol.
liscia bronchiale

edema della mucosa

secrezione di muco



IL COMPLEMENTO

a cura di Giada Zecchi

Alla fine del 1800 Nuttall aveva capito che era presente qualcosa di litico nel siero degli animali o delle persone immunizzate contro qualche agente patogeno. Si è però dovuto aspettare un po' di tempo per capire che nel siero c'era un'attività termolabile, in grado di lisare i batteri, quando gli animali erano sensibilizzati contro quei batteri. Termolabile significa che, prendendo il siero, e scaldandolo, ad esempio, per mezz'ora a 56°C, veniva persa la capacità di uccidere i batteri. Ciò significa che nel siero è presente una componente termolabile, unitamente ad una componente termostabile (ovvero, gli anticorpi).

L'esperimento era più o meno fatto in questo modo: venivano presi dei batteri, e del siero iperimmune (ovvero da un animale immunizzato più volte) verso i batteri, tale siero uccideva i batteri. Tale siero perdeva la sua attività litica con un riscaldamento a 56°C per mezz'ora. Un altro siero proveniente da un animale non immunizzato non uccide ovviamente i batteri, ma è capace di "complementare" l'attività litica del siero scaldato.

Esempio alla lavagna: nella prima provetta è presente siero iperimmune, che messo a contatto con la coltura batterica ne provoca la lisi. Lo stesso siero iperimmune, scaldato a 56°C, non provoca nulla. Un siero normale, cioè da un animale non immunizzato (II° provetta) non è in grado di uccidere i batteri, però, quando il siero scaldato dall'altra provetta, veniva aggiunto, si aveva il killing dei batteri. Questo dimostrava come nel siero fossero presenti due componenti:

- termolabile, ed aspecifica
- termostabile, specifica

Quella termolabile è data appunto dalle proteine del complemento, quella termostabile è data invece dagli anticorpi.

Il concetto di base, dunque, era che il siero contiene delle molecole capaci di uccidere batteri, ovviamente dando siero immune contro quei determinati batteri; lo stesso siero scaldato non è in grado di uccidere il batterio, ma aggiungendo siero scaldato sopra i batteri, e siero fresco anche non immune, allora il siero fresco è capace di **COMPLEMENTARE** l'attività del siero riscaldato, cioè è in grado di indurre la lisi batterica, anche se il secondo siero, quello fresco, non contiene anticorpi contro i batteri. Questo concetto fu definitivamente capito da PAUL ERLICH che denominò **complemento** quell'insieme di sostanze capaci di complementare l'attività di un siero immune.

Dopo Erlich molti ricercatori identificarono varie componenti del complemento, dando ad esse i nomi più svariati:

1. Nel 1907, furono identificate due componenti, una acidolabile, e una acidostabile
2. Sack e Omorokow hanno successivamente studiato gli effetti del veleno di cobra, capace di inattivare la componente C3 del complemento, e per "scomplementare" (ovvero inattivare) il siero dei pazienti;
3. Gordon ha identificato che l'ammoniaca era in grado di inattivare la componente C4 del complemento.

Poco dopo questi esperimenti, è stato capito che esisteva anche un altro meccanismo per l'attivazione del complemento, che non dipendeva dagli anticorpi; questo meccanismo fu definito **via alternativa**. In seguito, è stato scoperto che esisteva un altro meccanismo ancora, che non faceva parte della via alternativa, ma che dipendeva dalla presenza di proteine di tipo **lectinico** presenti sulle membrane batteriche. Di fatto, ogni via, ha ricevuto una nomenclatura particolare; ad esempio, le proteine che entrano in gioco nella via alternativa sono state nominate con delle lettere.

Poiché tutto il meccanismo è formato da una serie di proteine che funzionano da proenzimi che devono essere in un qualche modo attivati, e vengono scissi in due parti, normalmente la scissione di una componente del complemento, viene identificata con delle lettere: per questo esistono le componenti C3a, e C3b, e non è detto che la componente “a”, sia più grande di “b”. Per quanto riguarda la via delle Lectine, invece, c’è una nomenclatura un po’ particolare, che utilizza una nomenclatura funzionale, ovvero si dà il nome alla proteina, in base a quello che fa: ad esempio, proteina che lega il mannosio, ecc..

Quando poi, andiamo a vedere le proteine che regolano il complemento, esse sono essenzialmente di due tipi, recettori e proteine solubili.

Quali sono le maggiori attività biologiche del complemento?

Abbiamo già visto la *capacità di provocare la lisi delle cellule bersaglio*. Ovviamente non si tratta solo di cellule batteriche, ma, il complemento, abbiamo già visto, interviene soprattutto nei meccanismi di citotossicità anticorpo-mediata (ADCC): ad esempio, nella glomerulo-nefrite, o nelle cardiopatie post-streptococciche, o nella miastenia grave. In tutti questi casi si ha l’attivazione del complemento, e il problema è dato dal fatto che in questo caso l’anticorpo reagisce contro componenti proprie dell’organismo, e si parlerà, come vedremo, di auto-immunità.

Alcune componenti del complemento, poi, sono in grado di indurre *attivazione di alcune cellule come neutrofili*, o fagociti mononucleati. Altre componenti del complemento sono in grado di *opsonizzare o gli immuno-complessi* o i batteri e indurre la fagocitosi, o la rimozione, se si tratta di immuno-complessi. Quindi, possiamo riassumere le tre attività espresse finora, che sono:

1. Lisi
2. Attivazione
3. Opsonizzazione

Esaminiamo ora, le tre vie.

- 1. Via classica:** Prende origine dal complesso antigene-anticorpo.
- 2. Via alternativa:** Innescata da molecole presenti sulla superficie di agenti patogeni.
- 3. Via della MBL:** Ovvero: **MANNAN BINDING LECTINE**, ovvero lectine che legano il mannosio. Tali lectine, che sono normali costituenti del siero, sono capaci di legare in maniera specifica il mannosio, presente in alcuni batteri capsulati.

Il risultato finale in tutti e tre questi meccanismi è l’attivazione del complemento, con opsonizzazione e killing. Qual è il punto in cui convergono le tre vie? Il punto di convergenza è quello che riguarda la C3 convertasi, che è l’enzima chiave del complemento, in grado di formare il componente C3b del complemento, che mette in moto tutte le strade che vedremo. La C3 convertasi, poi, induce anche la formazione di C3a, e C5a, tramite un altro meccanismo; queste sostanze sono le cosiddette ANAFILOTOSSINE, cioè tossine che mediano l’anafilassi, perché la loro presenza media fenomeni simili a quelli che si verificano nell’anafilassi.

Tali vie, poi, portano alla formazione di quello che viene definito “complesso di attacco alla membrana”: **MAC**, formato da una serie di proteine che si dispongono in un certo modo e provocano la produzione di numerosi pori sulla membrana della cellula bersaglio, che andrà così incontro a lisi osmotica.

Il complemento è formato da molti gruppi di molecole. Tali molecole appartengono a varie famiglie, e possono essere catalogate anche a seconda della loro attività funzionale, che può non essere soltanto quella di funzionare come agente del complemento. Ad esempio, ci sono molte correlazioni tra alcune molecole in C1r e C1s, e molecole come la tripsina e chemotripsina, perché hanno tutte quante in comune un’attività serin-esterasica. Vediamo nella tabella, possibili similitudini tra molecole del complemento e molecole di altro genere.

Molecole del complemento

Molecole correlate

C1r – C1s

Tripsina - chemotripsina

SCR (short consensual repeat) presenti in alcune molecole regolatorie del complemento, e in C1rs; sono sequenze di 60 aminoacidi.

Recettore per IL-2 - β 2 glicoproteina I
- fattore XIII della coagulazione.

Molecole formanti pori, ovvero complesso di attacco alla membrana (MAC), soprattutto C8 e C9.

Perforina, nei granuli dei linfociti T citotossici, o NK; proteine cationiche degli eosinofili.

CR3, detto anche p150-95, che è il recettore di tipo III del complemento ha catene in comune con le integrine.

Integrine : LFA-1, che media l'adesione intercellulare.

Le caratteristiche comuni di queste molecole facenti parte del complemento, e le altre molecole ad esse correlate deriva dal fatto che esse hanno avuto un gene ancestrale di origine comune, dal quale poi, si sono evolute separatamente.

Vediamo ora, una famiglia di proteine molto importante:

Proteine complementari di controllo: CCP

Hanno tutte caratteristiche molto importanti:

1. Sono tutte codificate nel cromosoma 1
2. Possiedono tutte uno stesso dominio di 60 aminoacidi, detto *short consensus repeat*, SCR;
3. A livello funzionale sono in grado di inibire la formazione stabile, nelle vie classica e alternativa, della C3 convertasi; bloccano cioè la C3 convertasi subito dopo che si è formata. La C3 convertasi può essere formata da vari componenti : nella via classica è formata dal **C4b2a**, nella via alternativa , invece, è formata dal **C3bBb**.
4. Esistono 6 diversi tipi di proteine:
 - a. il **fattore H** , che è presente nel siero e ha una forma allungata.
 - b. **C4bp**, ovvero proteina legante il C4 , che ha una forma eptamerica a ragno con sette protuberanze. Questa molecola è in grado di legare il C4 in fase solubile; dunque, evita che il C4 venga scisso in C4a che se ne va e non entra a far parte del complemento, e C4b, che entrerà a far parte della C3 convertasi.

VIA CLASSICA VIA ALTERNATIVA

C3

C4b2b C3bBb

C3b

La C3 convertasi nella via classica è costituita da C3b2b, e nella via alternativa da C3bBb. L'attivazione delle C3 convertasi porta alla scissione del C3 in C3a che ha funzione di anafilotossina, e C3b che darà il via a tutta la cascata del complemento.

- c. **DAF**, o **CD55** è formato da un piede glicofosfolipidico ancorato alla membrana cellulare e da una porzione proteica contenente la sequenza di consenso. DAF= Decadiment accelerating factor, ovvero fattore che accelera il decadimento, laddove per decadimento si intende la rimozione del C3b e la sua degradazione in composti inattivi.
- d. **CD46**, o cofattore di membrana, presente sulle membrane plasmatiche, necessaria per scindere il C3b
- e. Ci sono poi, almeno quattro tipi di recettori:
 - Recettore di tipo I: CD35, presente un po' dappertutto, ma soprattutto sulla membrana dei globuli rossi e serve per eliminare immuno-complessi che hanno il complemento attaccato.
 - Recettore di tipo II: CD21, presente sui linfociti B; è poi, il ligando naturale di Epstein Barr

Cominciamo ora a vedere come queste molecole funzionano. Vediamo come viene attivato il complemento attraverso le tre diverse vie:

1. Nella **via classica**, viene attivato tramite le immunoglobuline, ovvero tramite gli immuno-complessi formati da IgM e antigene, oppure da IgG1, IgG2, o IgG3. Ci sono poi, dei virus, in grado di attivare la via classica, provocando la formazione della C4b2b, ovvero della C3 convertasi classica. Fra i virus sono importanti i retrovirus murini, e il virus della **STOMATITE VESCICOLOSA**, presente nell'uomo, che sono in grado di attivare la via classica promuovendo la formazione delle C4b2b. Ci sono poi, microrganismi come i micoplasmi, capaci di attivare nuovamente la via classica. Infine, ci sono altre molecole come i polianioni, soprattutto quando sono legati a cationi, che possono nuovamente attivare la via classica: ad esempio, ioni fosfato presenti nel DNA, oppure ioni SO_4^- , con due cariche negative, presenti nell'eparina, o nel condroitinsolfato.
2. Per quanto riguarda la **via delle lectine**, ci sono molti ceppi di batteri Gram+, o Gram-, che hanno sulla loro superficie dei gruppi mannosio, capaci di legare una proteina presente nel siero, ovvero la proteina che lega il mannosio, e mettere in moto la via alternativa del complemento.
3. La **via alternativa** può essere messa in moto da immuno-complessi, che contengono IgA o IgE. Tale via, però, è messa in moto, soprattutto da molti ceppi di batteri Gram+ o Gram-, come il tripanosoma, le leishmanie, e molti funghi. Anche eritrociti eterologhi possono mettere in moto la via alternativa, per motivi legati alla specie, tali per cui i globuli rossi di specie diverse, non legano il C3b, essendo il legame specie specifico.

Come possiamo catalogare le proteine del complemento?

Vediamo ora, una classificazione funzionale:

1. Proteine capaci di legare il complesso antigene-anticorpo. La più importante è la proteina C1q.
2. Proteina che lega il mannosio presente sulla superficie batterica; tale proteina è detta MBL.
3. Enzimi attivatori: C1rs, C2b della via classica, Bb della via alternativa e MASP 1, e MASP 2, della via delle lectine.
4. Proteine che si legano alla membrana e hanno funzione di opsonizzare: sono i derivati del C4, e del C3, ovvero sono C4b, e C3b.
5. Peptidi che mediano l'infiammazione, ovvero: C3a, C4a, e C5a.
6. Proteine che si attaccano alle membrane, ovvero: C5b, e MAC.
7. Componenti detti recettori del complemento, ovvero: CR1, CR2, CR3, CR4, C1qR.
8. Proteine regolatorie del complemento; per ogni singolo passaggio del meccanismo di attivazione del complemento esiste una proteina di controllo: C1 inibitore, C1 BP, CR1, DAF, MCP, fattore H, ecc.

Cominciamo a vedere ora, come sono fatte le proteine e come funzionano: il primo sistema che entra in gioco è il sistema C1qrs, ma la prima proteina che troviamo è C1q.

C1q

E' una proteina caratteristica formata da 6 subunità, con una testa globulare, e una coda allungata, che forma una specie di mazzo di tulipani. Ha un elevato peso molecolare, e ognuna delle sei subunità è formata da tre catene avvolte l'una all'altra ad α -elica. Il C1q è in grado di legarsi alle immunoglobuline, soltanto quando le immunoglobuline si trovano in una certa conformazione, in particolare quando le Ig hanno legato l'antigene, e si sono in un qualche modo aperte. Questo spiega perché non c'è un'attivazione continua, spontanea del complemento. C1q, dunque, si lega all'anticorpo, solo quando questo si è legato all'antigene, e dunque, ha cambiato conformazione, rendendo accessibili dei siti presenti nell'Fc, ovvero nel dominio Ch2 delle IgG, o nel dominio Ch3 delle IgM.

Un anticorpo, normalmente, viaggia nel siero in conformazione cosiddetta planare, cioè piana; quando trova l'antigene, vi si mette sopra, assumendo una forma definita a "fiocco" (o a uncino, a graffetta), permettendo l'esposizione di gruppi del dominio CH3, cui si legherà C1q.

La IgM, in forma planare, incontra il suo antigene presente ad esempio su una superficie batterica, e assume una configurazione a graffetta. C1q a questo punto può legarsi all'IgM, in rapporto 1:1, perché C1q possiede queste teste polari che sono quelle che legano il dominio CH3 delle IgM. Viceversa, per quanto riguarda le IgG, sarà necessario avere almeno un paio di IgG per legare le teste globulari del C1q. Una volta legato alle Ig, C1q è in grado di legare, attivando, due molecole di C1r, e due molecole di C1s. Tutto quanto forma il complesso **C1qrs**.

C1s funziona come esterasi serinica, capace cioè di attivare ciò che segue. C1s è in grado di tagliare il C4 presente nel plasma, in C4a, e C4b, di cui il C4a se ne va in giro, e il C4b si deposita sulla superficie batterica. Dopo di che un fenomeno analogo avviene per il C2: il C2, infatti si lega al C4 e viene tagliato, dall'unità C1s nuovamente, in C2a, e C2b, di cui C2a se ne va in giro, e C2b si lega al C4b già presente sulla membrana batterica, e si formerà così la C3 convertasi. La C3 convertasi, abbiamo già visto, è in grado di scindere il C3 in C3a, e C3b, di cui C3a se ne va in giro, e va a costituire la anafilotossina, e C3b rimane attaccato alla membrana alla C3 convertasi. Anticipiamo, poi, che la **C3b, legata alla C4b2b, costituisce la C5 convertasi**. Sia C che C4 hanno una struttura piuttosto caratteristica. Abbiamo visto che C4, di fatto, è il primo componente del complemento che si deposita sulla superficie batterica, e il suo deposito è qualcosa di assolutamente inscindibile, perché avviene attraverso legami covalenti.

Questo legame covalente ha luogo perché il C4 possiede al suo interno un gruppo reattivo tioesterico tra una glicina e una cisteina. Il C4 possiede nella sua catena α , un tioestere, che quando viene in un qualche modo esposto all'azione del C1s, rimane sul C4b. Tale gruppo tioesterico diviene molto reattivo; il taglio di questo gruppo tioesterico induce la formazione di un carbonio estremamente reattivo, perché possiede una carica negativa in più. Tagliando tra il gruppo sulfidrilico e la cisteina, si forma da un lato il residuo -SH, e dall'altro un carbonio che condivide un legame con il carbonio sovrastante, due legami con l'ossigeno, e una carica disponibile per un legame covalente, il quale si realizza con componenti della superficie batterica, in particolare con componenti idrossilici o amminici, che hanno una carica positiva. Il risultato finale è che C4 si lega in maniera covalente alla superficie cellulare. Un fenomeno analogo avviene anche per C3, in cui è presente un gruppo reattivo interno che viene continuamente tagliato, rendendo attivo il C3, che nel plasma diventa C3b, in piccole quantità. Tutto ciò è importante perché deve permettere l'attivazione della via alternativa, ovvero, quando il C3b viene legato dal fattore B attivato, presente sulla superficie batterica, e mette in moto la scissione di B in Ba, e Bb, il complesso C3bBb, forma la C3 convertasi nella via alternativa. Quindi, c'è un meccanismo continuo di attivazione di C3, detto meccanismo di attivazione a "**tick over**", che garantisce una costante, piccola attivazione del complemento.

Cosa avviene nella via alternativa? Tale via ha due ruoli:

1. Mettere in moto il complemento
2. Amplificare l'attivazione del complemento avvenuta tramite la via classica

Tali meccanismi, di amplificazione e di innesco, hanno di fatto, gli stessi punti di partenza, ovvero il C3b, che viene depositato sulla membrana batterica tramite la via classica, o tramite il meccanismo di *tick over*. Il risultato è che C3b viene depositato sulla superficie batterica e può legare il fattore B. Non succederà nulla fino a che non interviene un altro fattore detto **fattore D**, che può scindere il fattore B in Ba, e Bb, e si formerà il complesso C3bBb che costituisce la **C3 convertasi nella via alternativa**. Il C3b può essere depositato sulla superficie batterica tramite la via classica, e in questo caso la via alternativa amplifica la via classica, oppure per il meccanismo di *tick over*, cioè di generazione spontanea di piccole dosi di C3b.

Vediamo ora che i componenti finali di queste vie, sia classica che alternativa, portano concettualmente alla formazione dello stesso enzima, ovvero la C3 convertasi. A questo punto il C3b si deposita vicino alla C3 convertasi dando luogo ad un altro enzima che è la C5 convertasi.

La C5 convertasi farà produrre i prodotti finali del complesso d'attacco alla membrana, ovvero il C5 che sarà scisso in C5a, e C5b, il **C6, il C7, il C8, e il C9**. Quindi, abbiamo detto che si forma la C5 convertasi che, secondo la via classica sarà formata da C4b2b3b, mentre nella via alternativa sarà formata da C3bBb3b. Il risultato finale è che la C5 convertasi scinde la molecola C5 in C5a, che è il frammento più piccolo, e in C5b; il C5a diventerà un'anafilotossina, mentre il C5b si deposita di nuovo sulla membrana batterica dove si è depositata la C5 convertasi. Il C5b, una volta legato, permette di legare il C6; a questo punto il complesso C5bC6 legherà C7. Il legame del C7, comincerà a permettere al complesso di infiltrarsi nello strato lipidico della membrana, soprattutto quando si lega anche C8. Il complesso C5bC6C7 è un complesso anfifilico, che cioè ha una componente idrofilica, e una lipofilica, che è in grado di cominciare ad inserirsi nella membrana plasmatica. Al complesso C5bC6C7, si legherà C8 che permette l'attacco e la polimerizzazione del C9, che è il componente finale del complemento. Tale legame con C9 è complesso perché C9 forma dei grossi polimeri, che possono arrivare fino a 16 molecole i quali polimerizzano e formano un poro sulla membrana. Il risultato è la formazione di pori di 10 nm di diametro che permettono l'entrata e l'uscita di soluti. (C9 e la perforina sono codificati da geni assolutamente analoghi). Questo dunque, è il MAC, ovvero il complesso d'attacco alla membrana.

Ricordiamo che le tre vie di attivazione del complemento, convergono sul C3b, ed esiste un'**omologia** tra le molecole costituenti tali vie. Si parla di omologia, e non di analogia, perché in questo caso i geni che hanno un ruolo nelle varie vie sono simili tra loro, e i vari componenti del sistema immunitario si sono evoluti da un unico gene ancestrale comune. Tutte le 3 vie danno come risultato finale la produzione di pori sulla membrana della cellula bersaglio, allo scopo di eliminare agenti batterici. La genesi di pori, però, non è l'unica modalità di eliminazione batterica, messa in atto dal nostro organismo: esistono infatti, durante la formazione dei componenti attivi del complemento, molecole intermedie che permettono, comunque, di eliminare i microorganismi, con metodi diversi dall'attivazione del complemento.

Chi costituisce il complemento? La maggior parte delle molecole che costituiscono il complemento vengono sintetizzate a livello epatico; altre molecole, poi, vengono secrete, seppur con minor rilevanza, da fibroblasti, endotelio, macrofagi, monociti, ecc. Quando abbiamo dunque, una grave insufficienza epatica, si può assistere ad un vero e proprio deficit delle componenti del complemento, ma anche ad un deficit delle componenti regolatorie del complemento, con gravi conseguenze, in quanto, anche se attivato, il complemento non è comunque, regolato. Il complemento è presente nel plasma in quantità abbastanza significative: **C3 ha una concentrazione di circa 0,5/1,3 mg/ml**. Le altre componenti, invece, hanno una concentrazione molto ridotta.

Le proteine regolatorie del complemento possono essere suddivise in due grandi gruppi:

1. quelle presenti nel PLASMA:
 - a. C1-inibitore
 - b. Fattore I
 - c. Fattore H
 - d. C4bp
 - e. Carbossipeptidasi N
2. quelle ancorate alla MEMBRANA:
 - a. CR1, CR2, CR3, CR4
 - b. DAF

Essendo C3 la componente maggiormente rappresentata a livello plasmatico, vediamo il ruolo. Innanzitutto, vediamo che C3 possiede un gruppo tioestere tra glicina e cisteina, e presenta dunque, un legame S-C. Tale carbonio è particolarmente reattivo perché, quando il C3 viene scisso in C3a, e C3b, induce la rottura del ponte tra S, e C :

1. C3a funzionerà da anafilotossina
2. C3b, contiene il gruppo ad alta reattività, e si legherà ad un accettore, in modo da svolgere la propria funzione.

C3b può essere inattivato dal Fattore I, che stacca un fattore C3f dal C3b; rimane il frammento iC3b, il quale viene ulteriormente degradato dal Fattore I e dal CR1. Si libera il fattore C3dg, scisso poi, mediante l'aiuto di proteasi plasmatiche, in **C3g** e **C3d**.

Dalla via alternativa è possibile ricavare metodi per amplificare il segnale derivante dall'attivazione della via classica mediante C3; infatti, il C3b, per mezzo del gruppo tioestere, si lega alla membrana in modo covalente. In presenza di ioni Mg^{++} , poi, il C3b attacca il Fattore B, mettendo in moto la via alternativa. Il Fattore D trasforma B in Ba, e Bb, che rimane legato al C3b.

L'insieme C3bBb rappresenta la C3 convertasi della via alternativa, in grado di scindere C3 in C3a e C3b. Si può dunque affermare che la via alternativa ha due importanti funzioni:

1. attiva il complemento quando non sono presenti anticorpi
2. amplifica la risposta della via classica.

Di norma il legame tioestere, avviene in vicinanza di superfici batteriche, e il C3b si deposita dove capita, attivando la C5 convertasi della via alternativa:

- a. Se ciò avviene sulla superficie di cellule normali, il tutto viene bloccato da fenomeni regolatori.
- b. Se, invece, ciò avviene sulla superficie di cellule batteriche, il processo prosegue, con la formazione de MAC.

Naturalmente, il complemento non è in grado di riconoscere il self dal non-self: le cellule eucariotiche, però, in maniera specie specifica, sono in grado di inattivare determinate componenti del complemento. Quando ciò non accade, il tessuto su cui avviene la reazione viene distrutto, inducendo una patologia. Di norma, però, eventuali elementi attivati del complemento, che si depositano sulla membrana delle cellule dell'organismo, vengono rimossi o comunque inattivati.

Un accenno merita in particolare il Fattore H il quale interviene nella regolazione del complemento sia in fase fluida, che quando esso è adeso alla membrana cellulare:

1. In fase fluida: disattiva la C3bBb della via alternativa, in quanto il fattore H è in grado di legarsi in modo più forte al C3b, rispetto al fattore Bb.
2. Attaccato alla membrana:
 - a. il fattore H non è in grado di legarsi al complesso C3bBb, se ad esempio la C3 convertasi è attaccata ad una “MEMBRANA ATTIVATRICE”, tipica di agenti patogeni. Tale membrana, infatti, non possiede residui di acido sialico, a cui il fattore H possa attaccarsi.
 - b. Il fattore H è in grado di legarsi al complesso C3bBb, se ad esempio, la C3 convertasi è attaccata alla membrana di cellule del nostro organismo, la quale è ricca di acido sialico. In tale modo la C3 convertasi viene inattivata, perché il fattore H si sostituisce al fattore Bb.

Altre molecole che svolgono un ruolo molto importante nell'inattivazione del complemento, laddove tale attivazione si riveli inappropriata, sono rappresentate dai recettori per il complemento. Essi possiedono fondamentalmente due funzioni:

1. Rimuovere i componenti del complemento dal circolo:
 - a. CR1: Lega C3b e C4b, e ne promuove il decadimento, permettendo cioè l'attività del fattore I. Tale recettore è importante nella rimozione degli immunocomplessi, perché nel plasma si formano continuamente complessi antigene-anticorpo, dannosi in fase liquida, ma se il C3b si lega ad una porzione dell'immunocomplesso, quest'ultimo può legarsi alla superficie dell'eritrocita che esprime il CR1. In tal modo l'eritrocita ricopre l'immunocomplesso, che attaccati alla membrana di una cellula non sono dannosi.
 - b. CR2: Presente sui linfociti B, attiva tali linfociti B, ma funziona anche come recettore per il virus di Epstein Barr.
 - c. CR3 e CR4: sono integrine in grado di stimolare la fagocitosi

Attraverso la via lectinica e la via alternativa, il C3b può formarsi prima che si venga a costituire l'immunocomplesso: questo è importante nel caso di infezioni da meningococco, in cui la risposta immunitaria deve essere immediata, e non si ha il tempo di aspettare l'attivazione della risposta anticorpale. L'attivazione della via lectinica è importante perché nel plasma è presente MBP, ossia proteine leganti il mannosio che attivano delle serin esterasi, (MASP 1 e MASP 2) in grado di funzionare come C3 convertasi, che scinde il C3 in C3a e C3b. Il C3b può depositarsi sulla parete batterica favorendo la fagocitosi del batterio da parte del neutrofilo, prima che si formino anticorpi.

Tali recettori, poi, possono legare anche quelli che sono i componenti derivanti dall'inattivazione del C3b: iC3b, C3d, che vengono legati da CR2. Il CR3, invece, lega iC3b.

2. rinforzano la risposta immunitaria specifica, oltre a quella aspecifica.

Abbiamo detto che il C3b è in grado di legarsi al CR2 (o CD21), presente sulla superficie dei linfociti B. Quando una IgM si lega ad un antigene presente sulla cellula batterica, partono una serie di segnali che permettono la produzione di anticorpi, e questo costituisce il primo segnale. E' necessario però che arrivi anche un secondo segnale ai linfociti B, e ciò è reso più facile dalla presenza di CR2. CR2, infatti, è fisicamente associato alla proteina CD19, che ha come proteina trasduttoria CD81. La messa in moto di tale complesso tri-molecolare CD21-CD19-CD81, fa partire un segnale co-stimolatorio che aumenta di circa 100 volte il primo segnale.

Ricapitolando:

1. se abbiamo un microrganismo ricoperto da IgG ed elementi del complemento, esso viene fagocitato dai macrofagi, il quale espone il recettore per Fc delle IgG e il CR1 per il legame con C3b.
2. se abbiamo un batterio ricoperto da IgM ed elementi del complemento, esso non viene fagocitato dal macrofago, il quale non presenta il recettore per Fc delle IgM. Però le IgM attivano molto di più il complemento, perché grazie alla forma pentamerica, hanno molte più possibilità di attivare C1q. Ci sarà dunque, una minor fagocitosi, a un maggior killing da parte del complemento.

ANAFILOTOSINE

In particolare consideriamo la **C5-des-arg (C5 desarginata)** . Per azione della C5 convertasi, il C5 è scisso in:

- C5b che entra a far parte della cascata del complemento
- C5a che è un'anafilotossina cioè una molecola di notevole importanza nel provocare un'inflammatione acuta.

La C5a ha un'emivita abbastanza breve, in quanto viene rapidamente degradata da una carbossipeptidasi, la quale toglie un residuo di arginina al C5a, facendola diventare C5a desarginata. Il C5a ha le seguenti funzioni:

1. Attiva il neutrofilo
2. Aumenta l'aderenza del neutrofilo all'endotelio,
3. Favorisce la chemotassi, ossia la migrazione del neutrofilo dal plasma ai tessuti
4. Attiva il monocito
5. Degranula le mastcellule, mimando il meccanismo di tipo allergico. Vengono così rilasciate ammine vasoattive, che contraggono la muscolatura liscia vasale, aumentando la permeabilità.

Il risultato di tutto ciò è una consistente infiammazione a livello locale, dove il complemento è stato attivato, con conseguente produzione di C5a.

Altre anafilotossine oltre C5a, sono C3a e C4a, che sono in grado di aumentare la permeabilità e la contrazione dei muscoli vasali, favorendo la chemotassi. Esistono poi, recettori per C3a e C5a, che appartengono alla famiglia delle proteine G, che hanno la caratteristica di presentare 7 domini transmembrana, il dominio NH₂-terminale in sede extracellulare, e un dominio GTP intracellulare, in grado di trasdurre il segnale. Tali recettori per le anafilotossine sono collocati su: mastcellule, basofili, neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi, endoteli, muscolatura liscia, e linfociti.

L'azione più potente esercitata da C5a, potrebbe essere legata alla presenza di più recettori su tipi cellulari differenti; il C5a lega il proprio recettore su un monocito, attivandolo, in modo che quest'ultimo produca IL-1 e TNF, il quale aumenta l'infiammazione locale. Tali meccanismi portano ad un'amplificazione del danno, il quale però è inizialmente positivo per l'organismo, in quanto permette di richiamare le cellule dell'infiammazione. Il controllo di tali meccanismi avviene:

1. grazie al fatto che tali reazioni sono autolimitantesi, ossia, una volta che la C5 convertasi ha formato una certa quantità di C5a, la sua attività si spegne perché:
 - a. la C5 convertasi viene inattivata
 - b. viene consumato il C5, che non essendo presente in grande quantità nel plasma, una volta che è stato distrutto, deve essere riformato.
2. grazie ad enzimi che si legano alle anafilotossine, inattivandole in circolo.

GENETICA DEL COMPLEMENTO

Il cromosoma più ricco di geni che codificano per componenti del complemento, è sicuramente il cromosoma 1, sebbene possiamo vedere come, ad esempio, il componente C3 sia codificato a livello del cromosoma 19, e la PFC (properdina) sia codificata a livello del cromosoma X. Possiamo quindi, supporre che il cromosoma 1 rappresenti il cromosoma su cui si trovasse il primo gene ancestrale, da cui si sono evoluti tutti gli altri. Molto interessante, poi, è esaminare il rapporto tra gruppi sanguigni e complemento: il CR1, ossia il recettore per C3b, è collocato sugli eritrociti. Prima di capire che CR1 era un componente del complemento, esso ha sicuramente contribuito ad aumentare la “confusione” classificatoria dei gruppi sanguigni. Il CR1 ha cioè, un certo numero di varianti alleliche, ossia un certo grado di polimorfismo, in alcune regioni rispetto ad altre. A seconda dei polimorfismi si parlerà di proteine diverse. I globuli rossi sono dunque, stati classificati in vari gruppi a seconda della variante allelica che presentavano, riguardo il CR1.

Anche DAF, e C4, sono presenti sui globuli rossi e anch'esse presentano un discreto grado di polimorfismo. Si parlerà dunque, di **COMPLOTIPO**, intendendo varianti alleliche del complemento che possono funzionare come marcatori genetici.

RUOLO DEL COMPLEMENTO NELLE MALATTIE

Il complemento risulta attivato nelle seguenti malattie:

1. Biocompatibilità e shock:
 - a. shock anafilattico
 - b. reazione post-trapianto
 - c. reazione infiammatoria al catetere
 - d. reazione infiammatoria al by-pass
 - e. ADRS (adult distress respiratory syndrome)
2. Reazioni dermatologiche autoimmuni
3. Situazioni neurologiche:
 - a. miastenia
 - b. lupus cerebrale
 - c. sclerosi multipla
 - d. malattia di Alzheimer
4. Diverse situazioni patologiche a carico dei reni

Esistono (rare, in verità) malattie dovute al deficit di un qualche componente del complemento:

1. Carenza del C1-inibitore: porta all'angioedema ereditario, in cui si ha un'eccessiva attivazione di C2 e delle chinine.
2. Carenza del C3: porta ad alterata opsonizzazione e aumento delle infezioni batteriche.
3. Carenza di C8 e C9: induce minore o assente capacità litica, con aumento delle infezioni da meningococco.

Si è infine visto come i microrganismi, per cercare di opporsi all'attivazione del complemento, si siano evoluti, mettendo in atto particolari strategie:

1. Salmonella e Klebsiella presentano lipopolisaccaridi che non legano il C3, o possono legare il fattore H, che è in grado di bloccare la C3 convertasi.
2. E. Coli blocca la fase finale della formazione del MAC.
3. Pseudomonas aeruginosa taglia il C1q.

I microrganismi sono inoltre, in grado di produrre proteine analoghe alle proteine regolatorie del complemento come C4bp, o DAF, come accade nel caso del virus dell'HIV.

IPERSENSIBILITÀ DI TIPO III

(a cura di Giada Zecchi)

Nell'ipersensibilità di tipo III°, rientrano le cosiddette malattie da immunocomplesso. Che cos'è un immunocomplesso? E' una struttura macromolecolare che si forma quando anticorpo e antigene sono presenti in fase liquida, e in concentrazioni ottimali.

Nei vecchi testi di immunologia ampio spazio è dedicato al fenomeno della precipitazione. Se si prende un siero immune (che contiene cioè anticorpi verso un dato antigene), e si uniscono ad esso piccole quantità di antigene, all'inizio non si verifica nulla, poi, man mano che aumentiamo la quantità di antigene, si formano dei precipitati, e man mano che aumenta la quantità di antigene, i precipitati si sciolgono. La formazione di immunocomplessi avviene quindi quando c'è una buona equivalenza tra anticorpo e antigene: avremo dunque, una quantità adeguata di anticorpi, almeno bivalenti, e una quantità adeguata di antigeni, almeno bivalenti. Una volta che il complesso si è formato, abbiamo due possibilità:

1. l'immunocomplesso prende la via plasmatica e si distribuisce nell'organismo
2. l'immunocomplesso si deposita in qualche distretto

Quali sono le caratteristiche della formazione degli immunocomplessi?

Sono tre le situazioni in cui si può avere la formazione di un immunocomplesso, e tutte e tre queste situazioni sono accomunate dalla **persistenza dell'antigene**. Tali situazioni sono:

1. **INFEZIONE CRONICA**: Si tratta di una infezione persistente ovviamente di grado abbastanza limitato, cioè non eccessivamente severa. Tipicamente, possiamo ricordare la lebbra, la malaria, la febbre emorragica, ma soprattutto l'epatite virale e l'endocardite da stafilococco.
2. **PATOLOGIE AUTOIMMUNI**: quando cioè il sistema immunitario riconosce degli agenti self come estranei, e fa una risposta contro di essi. In questa situazione si formano immunocomplessi che in qualche modo vanno in circolo, vengono rimossi dagli eritrociti o dai fagociti mononucleati, ma quando la formazione di immunocomplessi supera la capacità di rimozione del sistema immunitario, gli immunocomplessi vanno a spasso e tragicamente si depositano laddove non riescono più a passare. Il deposito provoca l'attivazione del complemento, che viene fissato, dando così il via a tutta la cascata del complemento. Le patologie autoimmuni in cui abbiamo il coinvolgimento di immunocomplessi sono numerose: LES, artrite reumatoide.
3. **INALAZIONE DI AGENTI ANTIGENICI**: Ci sono due situazioni tipiche:
 - a. malattia dell'allevatore di piccioni
 - b. polmone del contadino

Coloro che allevano piccioni sono esposti quotidianamente all'inalazione di actinomiceti, caratteristici di questi animali, che sono presenti anche nel fieno ammuffito. Quello che ne risulta, è un'alveolite molto seria. L'actinomiceto viene inalato, arriva negli alveoli, dove viene attivata la risposta anticorpale, e si formeranno gli immunocomplessi che si depositeranno sulla parete degli alveoli provocando danni considerevoli.

Quali sono le malattie più importanti da immunocomplesso?

La malattia da immunocomplessi è qualcosa di assolutamente aspecifico dal punto di vista della localizzazione, cioè può verificarsi ovunque come conseguenza della deposizione di immunocomplessi in varie sedi. Ad esempio, quando si forma un immunocomplesso circolante, che si può depositare nel sistema vascolare, si ha una vasculite, e poiché i vasi sono ovviamente presenti in tutto il nostro corpo, tale malattia può colpire ogni distretto del nostro organismo. Per quanto riguarda l'artrite reumatoide, essa colpisce soprattutto le articolazioni: si formano anticorpi anti-IgG, che si depositano nella capsule articolari, e provocano danno. Il lupus eritematoso sistemico è una patologia importante in cui in cui il coinvolgimento vascolare può essere presente o meno. In questa malattia è comunque tipica la deposizione in distretti come la cute o le articolazioni, ma soprattutto i reni, e le membrane sierose, come pleure, pericardio ecc.. La poliarterite, è anch'essa caratterizzata dalla deposizione essenzialmente nel distretto vascolare, ma anche in altri organi, come l'apparato muscolare, il sistema nervoso, il parenchima epatico ecc.. La crioglobulinemia è la cosiddetta patologia degli anticorpi freddi, anticorpi, cioè, che precipitano solo a 4°C (*in vitro*, ovviamente, dato che *in vivo* non è facilissimo arrivare a 4°C!), ovvero causano problemi a livello dei punti più freddi dell'organismo: punta delle dita, orecchie ecc.. Queste dunque, sono tutte malattie in cui il sistema immunitario riconosce componenti self, come se fossero estranee, e fa contro di esse una risposta.

Per quanto riguarda invece, le malattie causate da agenti patogeni, quali batteri, è importante ricordare alcune di queste patologia, come ad esempio, la tripanosomiasi, che è caratteristica per la formazione di immunocomplessi a livello del cuore e del cervello. Il sistema vascolare, rispetto alle malattie autoimmuni, in queste patologie, è maggiormente risparmiato, mentre è particolarmente colpito il rene. In tutti questi individui, infatti, l'infezione batterica cronica porta alla deposizione di immunocomplessi a livello renale, e dunque, ad una patologia che è la glomerulonefrite.

MECCANISMO DI DANNO

Un anticorpo incontra il suo antigene, e si forma l'immunocomplesso; successivamente si ha l'attivazione del complemento, che essendo in fase liquida non può portare alla formazione del MAC, quindi la sua attivazione si arresta, non senza, però avere prodotto le anafilotossine C3a, e C5a. Di fatto, dopo che si è formato l'immunocomplesso, C1q può legarsi all'Fc dell'anticorpo, formando un legame altamente reattivo; successivamente verrà legato il C4, che sarà poi scisso in C4a e C4b, che si depositerà sulla superficie dell'anticorpo facente parte dell'immunocomplesso, e si formerà così la C3 convertasi sull'immunocomplesso. Tale C3 convertasi attiva CC3, si formerà C3b, che si attaccherà all'immunocomplesso. L'immunocomplesso viaggerà così con il C3b attaccato, dando origine alla C5 convertasi che scinderà C5 in C5a e C5b. Il meccanismo di attivazione del complemento si arresta a questo livello, perché non c'è nessuna membrana sulla quale l'immunocomplesso può depositarsi. Le anafilotossine che però sono venute a formarsi, permangono in circolo, e possono esplicitare la loro funzione:

1. esse innanzitutto, favoriscono la degranolazione di mastociti e basofili favorendo il rilascio di ammine vasoattive che provocano aumento della permeabilità capillare e contrazione della muscolatura liscia.
2. attivano poi, le piastrine, favorendo il rilascio del loro contenuto.

La seconda fase dell'attivazione è dovuta all'aumento della permeabilità dei capillari: l'endotelio, cioè, diventa più permissivo all'uscita di ciò che sta nel plasma. Gli immunocomplessi a questo punto, vanno a depositarsi sulla membrana basale.

A questo punto dunque, abbiamo l'immunocomplesso depositato sulla membrana basale: cosa succede? Ci sono tutte le condizioni per un'attivazione completa del complemento, e in particolare, si formerà il MAC, con tutti i danni che ne conseguiranno. A questo punto, poi, le anafilotossine esplicheranno un'altra funzione, ovvero quella di richiamare cellule che rispondono a stimoli chemotattici, ovvero i neutrofili che tenderebbero a fagocitare la membrana basale sulla quale l'immunocomplesso si è depositato. Non riuscendo a compiere la fagocitosi a causa delle dimensioni della membrana basale (**FAGOCITOSI FRUSTRATA**), viene però liberato tutto il contenuto dei granuli dei neutrofili, costituito per lo più da sostanze tossiche che inducono un danno tessutale considerevole. Anche le piastrine sono in grado di esplicare una duplice azione:

1. liberano il contenuto dei loro granuli;
2. si aggregano formando dei microtrombi.

Al danno tessutale, infine, segue un'inflammazione acuta.

Questo è di fatto lo schema principale di quella che è una patologia sperimentale studiata per anni, ovvero la **malattia da siero**. Prima però di parlare della malattia da siero, parliamo di quello che è un atro fenomeno sperimentale, ovvero la **reazione di Arthus**, che non è altro che la reazione causata dalla malattia da siero, ottenuta però a livello **LOCALE**, e non sistemica, come invece, vedremo nella malattia da siero.

Nel 1903 Arthus prese un coniglio, e gli iniettò sottocute del siero di cavallo sterile, scaldato almeno a 56°C (ovvero, "scomplementato"), e l'esito fu nullo, cioè il siero di cavallo non è tossico di per sé. Ripetendo più volte la prova, si è visto che dopo un po' di tempo anche dosi piccole del siero di cavallo sono in grado di provocare, a seconda delle vie di introduzione, fenomeni patologici nel coniglio. La conclusione è stata che il siero di cavallo è tossico per il coniglio sensibilizzato da e verso il siero di cavallo. Le prime volte che il siero di cavallo veniva iniettato per via intraperitoneale; la reazione di Arthus, invece, era provocata a livello locale, cioè il siero di cavallo veniva iniettato sottocute .

Il siero di cavallo era in questo caso un veicolo di antigeni non-self: se prendiamo un coniglio, e gli iniettiamo anticorpi di cavallo (ovvero: il siero), il coniglio riconosce i determinanti xenotipici del cavallo. Vengono chiaramente riconosciuti anche determinanti di altro tipo, come l'albumina. Il coniglio, dunque, si immunizza contro le proteine di cavallo e compie una risposta immunitaria contro di esse. In questo caso però, gli anticorpi sono in circolo, e l'immunizzazione è avvenuta per via sistemica. Nella 2° fase iniettiamo il siero di cavallo soltanto sottocute, ovvero in una zona localizzata, a questo punto avremo la formazione di immunocomplessi *in loco*, e attivazione del complemento a livello locale. Questo modello offerto dalla reazione di Arthus, scoperto nel 1903, è stato da allora utilizzato come modello chiave per studiare l'inflammazione acuta. E' stato utilizzato perché si poteva semplicemente vaccinare un animale con proteine di animali appartenenti ad altre specie: l'animale faceva una risposta immunitaria, si iniettavano poi, le proteine sottocute, e si induceva così una risposta localizzata acuta.

Non bisogna però confondere il meccanismo con cui si verifica la reazione di Arthus, con il meccanismo che interessa le reazioni allergiche: se ad un soggetto allergico viene iniettato l'allergene, si ha una reazione immediata, si forma cioè un ponfo in un tempo rapidissimo (pochi minuti). Le reazioni da immunocomplesso, invece, hanno bisogno di più tempo, perché l'antigene si deve depositare sul tessuto, e deve essere presente in quantità adeguata. Se infatti iniettiamo più antigene di quello necessario, perché cominci a vedersi qualcosa dovremo aspettare che l'antigene in eccesso sia rimosso dalle sedi di iniezione; quando è stato rimosso in quantità ragionevoli, allora comincia la formazione degli immunocomplessi. Dunque, nella reazione di Arthus, la formazione del ponfo a livello cutaneo richiederà almeno 5-12 ore, perché ci deve essere il tempo di rimuovere l'antigene in eccesso, formare l'immunocomplesso e innescare tutti i meccanismi.

La reazione da immunocomplesso localizzata, è stata la chiave per capire la **malattia da siero**, che a sua volta è stata un modello per capire la malattia da immunocomplessi. La reazione di Arthus, dunque, ha portato a vedere fenomeni non più localizzati, ma generalizzati.

Alla fine dell'800, la batteriologia e l'immunologia andavano di pari passo e si era capito che in alcune patologie infettive, come ad esempio, la rabbia o la difterite, era possibile proteggere l'individuo da morte quasi certa tramite l'immunizzazione passiva: si prendeva cioè, un animale, lo si immunizzava verso un certo patogeno in modo tale che dopo un po' il siero dell'animale fosse ricco di anticorpi; si prendeva poi, il siero dell'animale e lo si trasferiva nel paziente. Cosa succedeva? Esattamente la stessa cosa vista prima. Veniva preso un siero iperimmune verso un patogeno, e veniva iniettato. Fu Von Pirquet che nel 1911 notò che fenomeni come la reazione di Arthus potevano avvenire a livello sistemico, quando veniva somministrato al paziente un siero eterologo iperimmune. A questa patologia venne dato da Von Pirquet e Schick, il nome di **malattia da siero**. Essa è caratterizzata da un periodo di incubazione di 8-10 giorni, necessari per la produzione di anticorpi; quando poi, l'iniezione del siero avveniva per la seconda volta, anche con dosi immunizzanti molto minori, i pazienti andavano incontro ad una sintomatologia più seria.

***Descrizione originale di Von Pirquet e Schick:** Ad un bambino sono stati somministrati 200 cc di siero di cavallo anti-scarlattina; il settimo giorno ha sviluppato una malattia da siero grave. Dopo 38 giorni, lo stesso bambino sopravvissuto, ha ricevuto una seconda dose, ma di 1 solo cc: dopo 8 ore ha sviluppato una reazione locale di Arthus.*

Dunque, la prima reazione è stata quella di fare una malattia da siero, con la produzione di anticorpi anti proteine eterologhe, orticaria, edema, rigonfiamento, eritemi multiformi, dati dalla deposizione degli immunocomplessi che hanno determinato una vasculite generalizzata. Tutto ciò avveniva dopo sette giorni, quando il bimbo aveva cominciato a produrre anticorpi, e a formare dunque immunocomplessi in circolo. Dopo 38 giorno gli è stata dato 1 cc dello stesso siero, a livello intradermico, e dopo 8 ore il bimbo aveva febbre, gonfiore, laddove era stato iniettato il siero. Successivamente un rush generalizzato, perché dopo la reazione locale gli immunocomplessi sono andati in circolo e si sono depositati.

Anche quando un soggetto fa una risposta anticorpale contro un qualunque antigene, si ha la formazione di immunocomplessi che però vengono normalmente rimossi dal circolo. Esiste infatti, un'enorme efficienza nella rimozione degli immunocomplessi che avviene da parte di due tipi di cellule:

1. Da parte di tutte le cellule che possiedono il recettore per Fc delle IgG in grado di legare l'immunocomplesso, come monociti, macrofagi, neutrofili ecc..
2. Grazie al C3b che si lega all'immunocomplesso e in qualche modo lo opsonizza, e cioè lo rende legabile da cellule come i globuli rossi che possiedono CR1, in grado di legare C3b e rimuovere così l'immunocomplesso. Ogni globulo rosso possiede circa 700 recettori per il C3b sulla sua superficie. Considerando che per ogni mm^3 di sangue ci sono circa 5 milioni di globuli rossi, possiamo considerare che ci siano circa 3,5 miliardi di recettori per il C3b per mm^3 . Dunque, possiamo affermare che l'efficienza di clearance degli immunocomplessi dal circolo è notevole.

Il problema è che in alcune patologie autoimmuni c'è un enorme numero di molecole che si formano, per cui, quando la formazione di immunocomplessi supera la capacità di legame del sistema, abbiamo i fenomeni di deposizione.

Il complemento poi, gioca un altro ruolo importante: un immunocomplesso è tanto più insolubile quanto più è grande. Se prendo un immunocomplesso, e aggiungo una qualche molecola di C3b, si crea un impedimento sterico all'ingrandimento del complesso, che dunque, diventa più solubile. E' stata fatta una prova sperimentale in cui aggiungendo complemento agli immunocomplessi di un animale, tali immunocomplessi venivano rimossi più velocemente per due motivi:

- a. avveniva il legame tramite C3b al recettore.
- b. il complemento solubilizza gli immunocomplessi

Per capire che il responsabile di tutto ciò era il complemento si è fatto il seguente esperimento: il siero scomplementato, riscaldato cioè a 56°C, per mezz'ora, viene a perdere la sua capacità di legare l'immunocomplesso, e quindi, la solubilizzazione non avviene.

Rimane infine, da vedere il trasporto e la rimozione degli immunocomplessi, per merito dei globuli rossi. I globuli rossi, vanno in giro per l'organismo e finiscono nel fegato, dove incontrano le cellule di Kupffer che li distruggono. Anche gli immunocomplessi, solubilizzati dal complemento vanno al fegato dove vengono fagocitati dalle cellule di Kupffer. Sono rimossi, seppure in misura minore, dalla milza. Più è grosso l'immunocomplesso, più ha possibilità di essere rimosso da parte del fegato, perché ha più possibilità di trovare il recettore. Infine, se l'immunocomplesso è legato al globulo rosso, può essere rimosso, o dalle cellule epatiche, o può essere attaccato dal Fattore I, che opera a livello del C3b, scindendo C3b nei suoi vari componenti, inattivando così l'immunocomplesso.