



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL' AQUILA

**DISPENSE DI IMMUNOPATOLOGIA**  
CORSO DI FISIOPATOLOGIA E PATOLOGIA GENERALE,  
LAUREA MAGISTRALE BIOLOGIA DELLA SALUTE E NUTRIZIONE

PARTE 1 di 3

Docente  
Prof. ADRIANO ANGELUCCI

ANNO ACCADEMICO  
2017-2018

Capitolo 1  
INTRODUZIONE AL SISTEMA IMMUNITARIO  
(LEZIONE 08-03-18)

Gli obiettivi primari del Sistema Immunitario sono:

1. La DIFESA dell'individuo dagli organismi potenzialmente patogeni appartenenti a tutte le possibili specie parassite:

- VIRUS
- BATTERI
- PROTOZOI
- FUNGHI
- VERMI (ELMINTI E NEMATODI)

Tale obiettivo è fondamentale per la salute umana (le malattie infettive rappresentano le prime cause di morte su scala mondiale) e viene condiviso da tutti gli organismi pluricellulari: esiste una vera propria guerra tra agenti infettivi e ospiti in cui ognuno adotta evolutivamente nuove strategie di attacco e difesa. Il sistema immunitario rappresenta la miglior strategia di difesa.

Alcune delle cellule e dei sistemi di difesa del sistema immunitario vengono usate dall'organismo anche per scopi diversi da quelli strettamente legati alla difesa dai parassiti. Si può dire che il sistema immunitario sia PLEIOTROPICO in quanto svolge numerose funzioni al servizio dell'organismo. Queste funzioni sono il retaggio filogenetico di quelle svolte nei primi stadi di evolutivi del sistema immunitario (vedi sistema macrofagico e omeostasi tissutale), o sono funzioni parallele generate dalla specializzazione di alcuni meccanismi di risposta (recettori variabili e immunosorveglianza).

2. RIPARAZIONE DELLE FERITE
3. RIMOZIONE DELLE CELLULE APOPTOTICHE
4. MANTENIMENTO DELLA TOLLERANZA VERSO I BATTERI UTILI (SIMBIONTI)
5. PROTEZIONE DALLE NEOPLASIE (IMMUNOSORVEGLIANZA)

Queste funzioni sono altrettanto importanti per la salute dell'organismo e si basano su alcune CARATTERI E FUNZIONI PECULIARI del sistema immunitario:

- a. Fagocitosi: i macrofagi e i neutrofili sono fagociti cosiddetti professionali, coinvolti nell'omeostasi dei tessuti
- b. Ubiquitarietà: cellule macrofagiche sono distribuite in tutti i tessuti, mentre i linfociti sono concentrati in punti strategici di vedetta (organi linfoidi secondari)
- c. Capacità migratoria: la maggior parte dei leucociti ha un'ottima capacità migratoria seguendo i gradienti chemiotattici
- d. Conoscenza degli antigeni self (propri): il sistema immunitario durante lo sviluppo apprende quali siano gli antigeni propri e gli antigeni innocui (tolleranza immunologica)

Quest'ultimo punto è la strategia chiave adottata dal sistema immunitario negli organismi superiori: distinguere le strutture molecolari associate ai patogeni (PAMP) dalle strutture molecolari proprie (SELF). Il sistema riesce a fare questo usando recettori preformati (PRR) ma soprattutto recettori ad alta variabilità. La strategia generale del Sistema Immunitario si pone come obiettivo principale quello di riconoscere ed eliminare il NON-SELF o le strutture molecolari SELF-MODIFICATE. Così facendo attua un meccanismo di immunosorveglianza, tramite il quale controlla continuamente l'integrità antigenica del nostro corpo: il Sistema Immunitario ha in ogni momento una conoscenza precisa di ciò che accade all'interno dell'organismo e nell'immediata vicinanza, di ciò che è innocuo e di ciò che può provocare danno. Tale strategia risulta evolutivamente molto vantaggiosa in quanto permette di riconoscere antigeni di varia natura mai incontrati precedentemente, ma ha in sé dei "punti deboli". Vi è infatti la possibilità che antigeni innocui o self siano riconosciuti impropriamente come pericolosi. Per questo motivo, le strutture molecolari innocue e self devono indurre una TOLLERANZA immunologica. Ad esempio, la normalità di funzionamento del S.I. nei confronti di antigeni presenti sul polline è di NON RISPOSTA, perché il polline è di per sé innocuo. La tolleranza si manifesta tutte le volte che il S.I. non si attiva nei confronti di antigeni propri dell'organismo o di quelli esogeni innocui.

Un limite biologico della strategia di riconoscimento del non-self è rappresentato dal numero di recettori necessari per riconoscere TUTTI gli antigeni potenzialmente pericolosi, poiché sarebbe necessario un repertorio di recettori vastissimo. Per ovviare a questo deficit, la variabilità si raggiunge dopo ricombinazione somatica in modo che si producano un numero molto elevato di recettori ma ognuno dei quali viene espresso da un numero relativamente basso di cellule "monoclonali". Le cellule monoclonali, al momento del bisogno si riproducono, moltiplicando il loro numero. Deve esistere allora, un meccanismo che preveda la proliferazione delle cellule a valle dell'attivazione. Un ulteriore limite biologico di tale strategia è rappresentato dal TEMPO: occorrono anche settimane, affinché venga pienamente realizzata la risposta immunologica specifica verso un antigene nuovo. Questo tempo, che può essere sufficiente per difendere l'organismo, può essere sfruttato dal patogeno per moltiplicarsi: un virus può infettare molte cellule prima che il nostro S.I. abbia trovato il modo di combatterlo efficacemente, e in tale intervallo l'organismo manifesterà la malattia.

## 1.1 Meccanismi di difesa dell'immunità innata

Seppure tradizionalmente l'immunità venga divisa in INNATA ed ACQUISITA, non è vero che i due tipi di immunità siano funzionalmente distinti: in realtà, il limite fra queste due risposte è molto labile ed esistono elementi di sovrapposizione e soprattutto di comunicazione. L'unica differenza sostanziale è rappresentato dal fattore tempo: l'immunità innata normalmente funziona in modo più veloce: si attiva subito e rimane attiva per tutto il tempo della risposta immunitaria. L'immunità acquisita ha bisogno di più tempo, almeno di 12 ore per generare una risposta. L'immunità innata può essere definita più precisamente come immunità IMMEDIATA, secondo una definizione più corretta, e rappresenta la prima linea di difesa del nostro organismo. La tempistica è, perciò, la caratteristica davvero discriminante fra le due categorie di risposta.

Le primissime difese del corpo sono rappresentate dagli epitelii che rivestono il corpo: cute e mucose. L'importante ruolo della cute si evince proprio dalla pericolosità derivante da un suo eventuale danneggiamento (una ferita, un'ustione), che determina un ingresso facilitato per i patogeni. Gli epitelii rappresentano un'efficace difesa meccanica e chimica che viene meno in caso di danno.

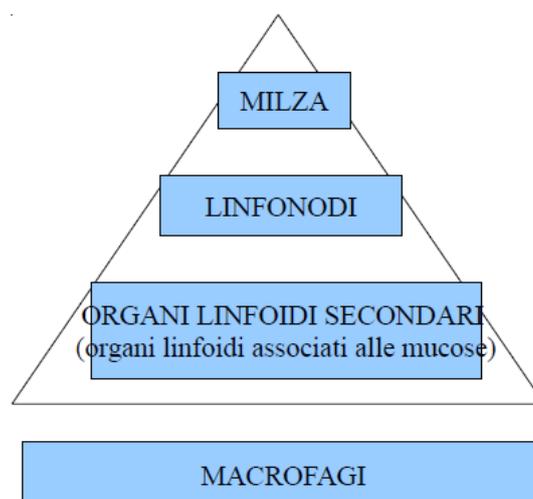
#### Meccanismi di difesa svolte dagli epitelii

MECCANICI = giunzioni serrate tra cellule, muco e movimento delle ciglia che allontanano continuamente i patogeni)

CHIMICI = pH acido, enzimi e peptidi antibatterici come le defensine, che vengono prodotte nell'intestino e grazie alla loro natura anfipatica riescono ad inserirsi nelle membrane e inducono la formazione di pori con conseguente morte per lisi della cellula

MICROBIOLOGICI = microbiota che impedisce la crescita di altri batteri secondo un fenomeno di competizione per risorse nutritive e spazio

Al di sotto degli epitelii le linee di difesa del sistema immunitario sono organizzate su diversi livelli ANATOMICI in modo da controllare sequenzialmente qualsiasi via di ingresso e impedire la libera diffusione di invasori patogeni. Si parte da una linea di difesa situata nel tessuto proprio al di sotto degli epitelii: si tratta sia delle cellule proprie del tessuto che fungono da "sentinelle" in grado di rilasciare segnali di stress o pro-infiammatori a seguito all'ingresso di microrganismi sia di macrofagi, ubiquitari nel nostro corpo. Dalla bocca e per tutto il tratto gastro-intestinale, al di sotto delle mucose, si trovano poi organi linfoidi secondari specializzati (MALT, organi linfoidi associati alle mucose) tessuto immunologico molto importante nel controllare gli antigeni



provenienti dalla mucosa. Esistono anche i filtri linfatici, i linfonodi, che raccolgono gli antigeni trasportati nella linfa, e il filtro ematico rappresentato dalla milza, che rappresenta la postazione di guardia del sangue.

Questi distretti contengono le principali postazioni di guardia contro l'ingresso di agenti estranei provenienti da varie vie di ingresso e assicurano l'intercettazione efficace degli antigeni estranei. Il sistema linfatico è quello che drena l'eventuale liquido da un tessuto infiammato spesso sede di edema. Esso esercita, quindi, un'azione di sorveglianza, tramite i linfonodi attraverso i quali passa il liquido infiammatorio. I linfonodi prossimali alla zona di infiammazione sono quelli che possono essere sede di prima attivazione del sistema dell'immunità acquisita a seguito di infiammazione infetta. Tale meccanismo fa capire bene quanto sia importante la presenza di cellule immunitarie a livello dei linfonodi. L'altro aspetto, oltre l'anatomia, che deve essere valutato per comprendere le modalità di attivazione del S.I. è come avviene il RICONOSCIMENTO di un agente patogeno.

### 1.1.1 *Ruolo dei recettori preformati nel riconoscimento del non-self*

Il PRIMO RICONOSCIMENTO, che deve essere il più rapido possibile, è attuato da recettori capaci di distinguono tra SELF e NON-SELF, e in particolare vengono riconosciute quelle strutture che SICURAMENTE sono non-self. Inizialmente, dunque, la distinzione è grossolana: se si tratta di un batterio, ad esempio, il primo step di riconoscimento è dato proprio dal distinguere cellule batteriche dalle cellule proprie. I batteri possiedono delle strutture chimiche distintive come il lipopolisaccaride (LPS) nei gram negativi, e gli acidi teicoici e lipoteicoici nei gram positivi che non sono sicuramente presenti sulle cellule proprie. Tali strutture non self hanno come caratteristica anche quella di essere condivise da più specie di potenziali agenti patogeni (tutti i batteri gram+, tutti i batteri gram-). Le molecole che mostrano tali caratteristiche sono denominate **PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern)**, proprio per indicarne il ruolo svolto sul sistema immunitario. I recettori in grado di riconoscere i PAMP sono chiamati **recettori preformati (PRR)**, categoria a cui appartengono diverse classi di recettori.

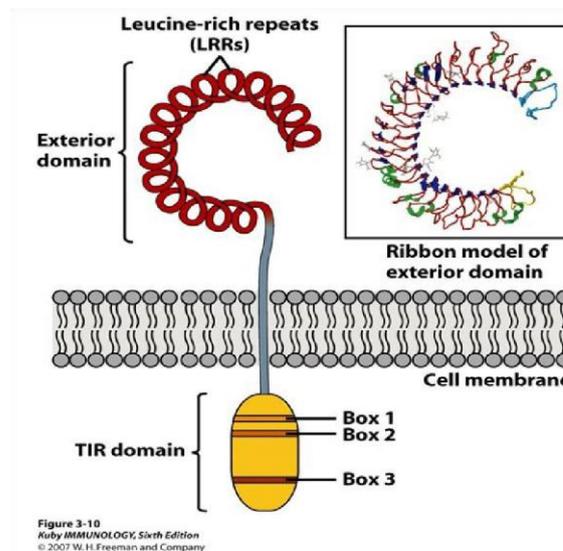
Tra i PAMP annoveriamo: LPS, acido lipoteicoico, la flagellina, alcuni zuccheri, come quelli ricchi in mannosio o in fucosio, che sono tipici di alcuni funghi e batteri, beta-glucani, ma anche alcune tipologie di acidi nucleici. Ad esempio la presenza di dsRNA all'interno dei fagolisosomi è la spia della presenza di un virus. Le isole CpG sono metilate secondo un controllo epigenetico che avviene soltanto negli eucarioti, non nei procarioti, dove queste sequenze saranno non metilate. Il loro riconoscimento quindi può servire per individuare un'infezione batterica.

Le principali famiglie di PRR che riconoscono immediatamente strutture non-self:

- RECETTORI TOLL- LIKE (TLR)
- RECETTORI DEI GLICANI (lectine C)
- RECETTORI NOD-LIKE (NLR)

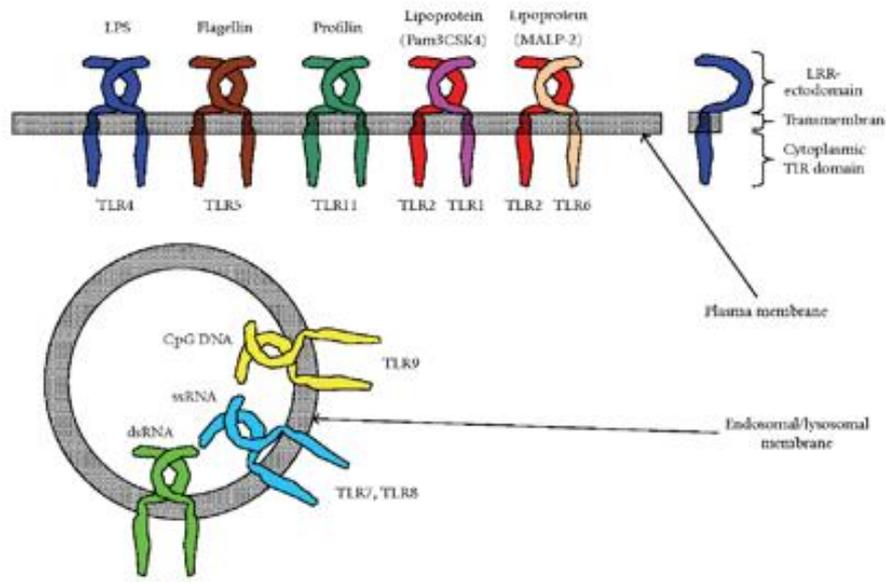
- RECETTORI RIG1-LIKE (RLR)

Alcuni di essi sono presenti sulla membrana plasmatica, altri sono legati alle membrane di vescicole interne, altri sono secreti, altri sono liberi nel citoplasma. Tra i più studiati sono i **recettori Toll-Like** che sono stati associati a anche a processi cellulari indipendenti dalla risposta immunitaria. I TLR sono formati da due catene uguali, dando origine ad un omodimero (TLR-4, TLR-5), o diverse, a dare un eterodimero (TLR-1 e TLR-2) conferendo diverse capacità di riconoscimento. Questi recettori trasmettono un segnale a valle grazie alla presenza di un dominio citoplasmatico chiamato DOMINIO TIR, che associandosi a proteine adattatrici può trasmettere il segnale di tipo infiammatorio (ad esempio, la presenza di NF- $\kappa$ B indica chiaramente che è stato



innescata una via di segnalazione pro-infiammatoria).

I Toll-like che si trovano sulla membrana riconoscono direttamente una struttura del patogeno (ad esempio un batterio Gram- o Gram+, tramite flagellina o lipopolisaccaride, etc...); altri sono presenti anche negli endosomi con la parte di riconoscimento/legame rivolta verso l'interno dell'endosoma. L'endosoma può essere legato ad un fagolisosoma e questo spiega come riescano a riconoscere gli acidi nucleici. Gli acidi nucleici raramente sono liberi nell' ambiente extracellulare, ma sono sicuramente presenti in un fagolisosoma dopo internalizzazione e distruzione del virus. Qui i recettori fungono da veri e propri sensori in grado di rilevare la presenza di un virus.



Vi sono inoltre i **recettori dei glicani o Lectine**: il termine "lectine" fa proprio riferimento alla capacità di queste molecole di riconoscere gli zuccheri. Tutti i recettori dei glicani allora sono delle lectine, ma ne esistono varie famiglie, come le lectine di tipo C, le ficoline e le pentrassine. Hanno delle strutture complesse, in cui ci sono più siti di legame: questi recettori li possiamo trovare legati alle membrane o liberi in soluzione.

Sono in grado di riconoscere quelle sequenze zuccherine atipiche, basate sul mannosio o fucosio; sono importanti anche perché esistono forme solubili coinvolte nell'attivazione del complemento e nell'opsonizzazione. Tra queste ultime ci sono alcune pentrassine che fanno parte della categoria delle proteine di fase acuta (es: proteina C reattiva, CRP). L'inflammation può avere anche dei risvolti sistemici: esiste un momento in cui il fegato rilascia le proteine della fase acuta tra cui alcune pentrassine, come CRP, un polipeptide in grado di legare zuccheri anomali, non-self. In questo modo, possono essere legati batteri o funghi in circolo nel sangue per renderli più facilmente riconoscibili ai macrofagi. La CRP è usata in diagnostica come indicatore di una inflammation in corso e quindi se supera un certo livello vuol dire che il S.I. è stato attivato e c'è una infezione, o almeno uno stato infiammatorio.

## Fagociti: NEUTROFILI e MACROFAGI

I macrofagi e i neutrofili sfruttano la fagocitosi principalmente come modalità di DIFESA. I macrofagi sfruttano la fagocitosi anche per la presentazione dell'antigene su MHC-II. Il linfocita B e la cellula dendritica possono fare fagocitosi, però non per difesa ma per la propria attivazione. Per questo motivo, macrofagi e neutrofili sono definiti come FAGOCITI PROFESSIONALI.

I macrofagi si differenziano dai neutrofili perché sopravvivono più a lungo; i neutrofili vivono in circolo per poche ore: in caso di inflammation arrivano al tessuto infiammato e li sopravvivono

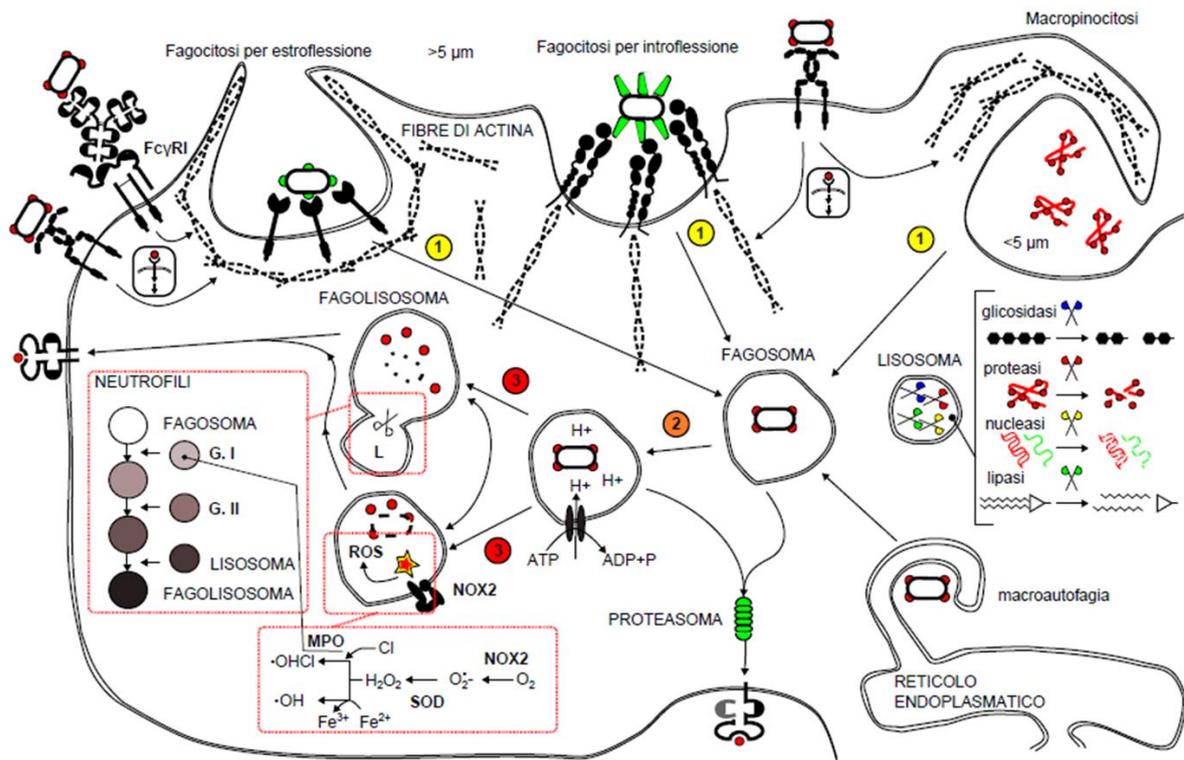
al massimo per 48h. In realtà, questo discorso sembra essere vero solo in parte. Infatti, usando strumenti sofisticati, sono stati colorati i neutrofili con sostanze fluorescenti e seguendo il loro tragitto in caso di infiammazione, si è visto che alcuni di essi arrivati nel sito dell'infiammazione ritornano in circolo e tornano al midollo osseo, passando per il fegato. Molto probabilmente questo si collega alle ultime scoperte che hanno dimostrato che anche l'immunità innata ha una sua memoria (trained innate immunity) e che cellule come macrofagi, monociti e NK sono condizionati epigeneticamente dai microrganismi che incontrano nella loro vita.

Tuttavia, un elemento di distinzione tra macrofagi e neutrofili è rappresentato dalla capacità di distruzione degli agenti infettivi: i neutrofili sono più potenti dei macrofagi. Il fenomeno di fagocitosi può avvenire secondo diverse modalità, tra cui l'estroflessione, l'introflessione, oppure per macropinocitosi di particelle più piccole di 5 micron; tali processi sono tutti controllati dal corretto allineamento delle fibre di actina.

Ma prima che si verifichi l'evento di fagocitosi vero e proprio, è necessaria una fase di riconoscimento, per cui i neutrofili ad esempio possiede recettori di tipo lectinico che riconoscono gli zuccheri presenti sul batterio e quindi questo manda un segnale che fa organizzare le fibre di actina in modo da fagocitare il batterio. Tale segnale sarà rinforzato da altri recettori preformati, che riconoscono il patogeno tramite altri elementi, come LPS, e manderanno un segnale. Viene effettuata cioè, una co-stimolazione. Un'altra modalità di riconoscimento avviene a valle del fenomeno di OPSONIZZAZIONE mediato ad esempio dalla CRP o dal frammento del complemento iC3b: un batterio opsonizzato viene riconosciuto più facilmente dal neutrofilo grazie alla presenza di recettori per CRP o iC3b.

Comunque sia, la sorte del materiale ingerito prevede la formazione del fagosoma che si legherà al lisosoma, un organello che contiene moltissimi enzimi degradativi come glicosidasi, proteasi, nucleasi, lipasi che digeriscono tutto ciò che è presente nel fagolisosoma, inattivandolo e distruggendolo. Gli enzimi lisosomiali possono essere molto potenti ma hanno dei limiti: occorre un ambiente acido favorevole alla loro attività e lavorano su substrati stampo riconoscendoli e disgregandoli: se un agente patogeno maschera i propri siti di digestione può sfuggire alla degradazione enzimatica. Ad esempio, il micobatterio della TBC è rivestito di uno stato ceroso che lo rende invulnerabile all'azione di enzimi lisosomiali. Per ovviare a questa problematica vengono sfruttate le specie reattive dell'ossigeno. Le specie reattive devono essere prodotte in modo "consapevole" perché se prodotte in modo incontrollato possono essere estremamente pericolose: ne è la riprova il fatto che i neutrofili muoiono rapidamente a livello del sito infiammatorio.

Si parla a tal proposito di SCOPPIO RESPIRATORIO (respiratory burst). Esistono enzimi, come la mieloperossidasi, presenti solo nei neutrofili che servono per produrre specie reattive particolarmente aggressive, come l'ipoclorito e l'acqua ossigenata che sono specie chimiche molto reattive capaci di distruggere i batteri.



### 1.1.2 II COMPLEMENTO

Il complemento è uno strumento dell'immunità innata, ma si attiva anche a valle dell'azione degli anticorpi, che sono prodotti dall'immunità acquisita. Tuttavia, parlando di complemento si fa riferimento all'immunità innata perché almeno una delle vie di attivazione è a valle di una lectina, in particolare di un MBL o una ficolina, una lectina solubile che riesce a riconoscere zuccheri presenti sull'agente patogeno ed a scatenare la reazione a valle. Il vantaggio è che si tratta di un meccanismo immediato.

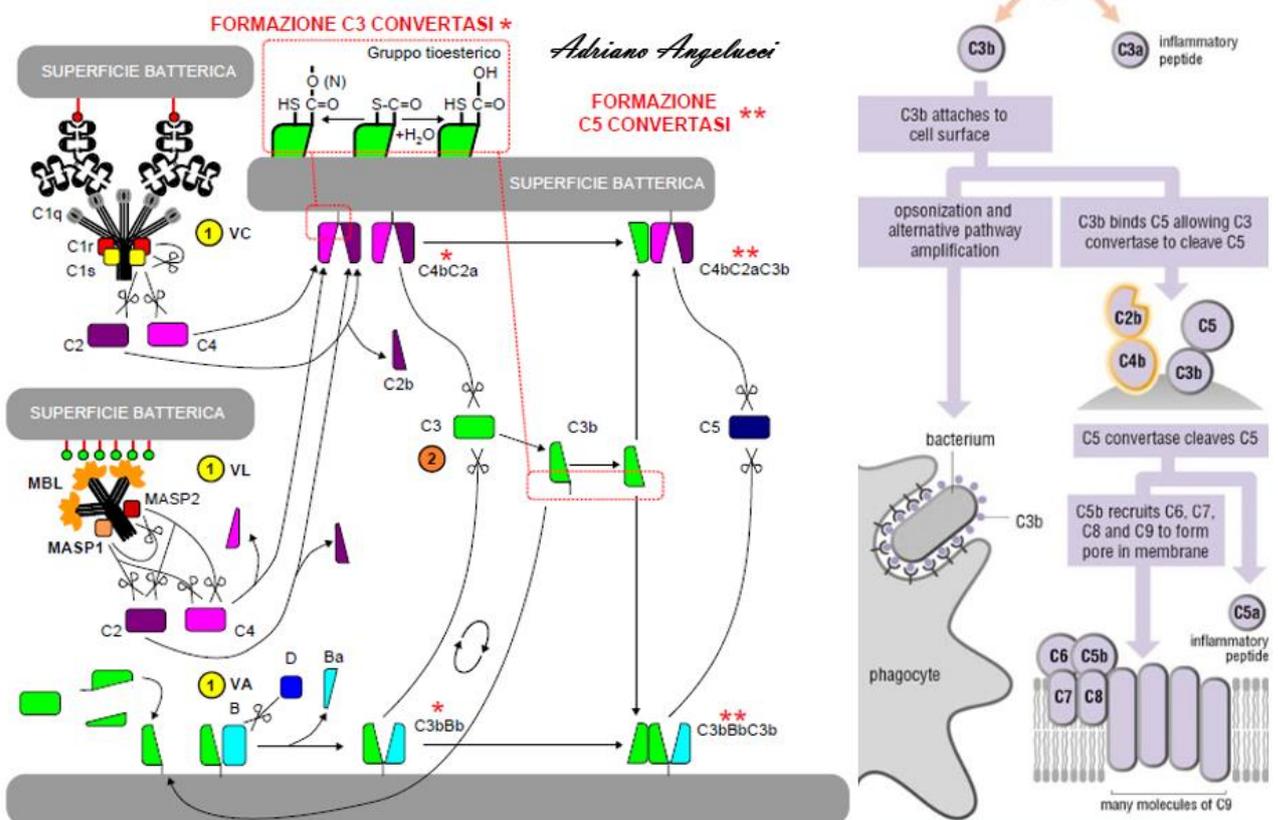
La via della lectina è solo una delle vie di attivazione: esiste una via classica, che avviene a valle di un legame anticorpo-antigene del patogeno. Anche in questo caso, la molecola che attiva il segnale è molto simile all'MBL, ma si chiama C1q. Queste due vie prevedono entrambe la formazione di un complesso C3 convertasi ma tramite l'utilizzo di una serie di reazioni intermedie diverse. La via alternativa, invece, è una via di rinforzo non prioritaria all'attivazione: è un sistema di autoalimentazione del processo che non avviene a seguito di un legame specifico, ma a seguito di un legame aspecifico di uno degli intermedi del complemento sulla superficie microbica. Fino a quando saranno presenti batteri, il sistema del complemento rimarrà attivato, anche in assenza di MBL o di anticorpi.

La cascata del complemento è un processo che viene così definito perché prevede l'attivazione a cascata di vari componenti, la maggior parte di questi presenti nel sangue si chiama C + numero. C1q è un fattore che si lega a valle del legame anticorpo-antigene, esiste anche C2 C4 etc. La

cascata prevede che le componenti a monte attivino quelle a valle tramite TAGLIO ENZIMATICO PROTEOLITICO. Ad esempio, dal taglio di C2 si formano due componenti C2a e C2b, dove b è la porzione in genere più grande con attività enzimatica. C2a è più piccola e non ha attività enzimatica ma può avere altre funzioni o soltanto quella di facilitare la formazione di complessi a valle. A valle di C1q c'è ad esempio bisogno dell'attivazione di C2 del C4 che si legano sulla superficie batterica formando C4bC2a (C3 convertasi) che è la responsabile dell'attivazione della proteina C3, che rappresenta il punto di convergenza delle due strade, della via classica e lectinica. Da questo punto in poi le due strade sono uguali: la formazione di peptidi pro-infiammatori, la formazione di iC3b e del complesso di attacco alla membrana. Il taglio di C3 porta alla formazione di C3a che non ha attività enzimatica ma è pro-infiammatorio quindi richiama i neutrofili nel sito di infiammazione. Il C3b fa propagare il segnale e ha attività opsonizzante, è una opsonina. Proseguendo, si trovano una serie di reazioni che coinvolgono i fattori mancanti come C5, C6, C7, C8, C9 per la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC); molte molecole C9 vanno ad inserirsi su una membrana formando dei veri e propri buchi. Quindi le tre funzioni legate all'attività del complemento sono:

- FUNZIONE PRO-INTIAMMATORIA (C3a E C5a- chiamate anche anafilotossine)
- FUNZIONE OPSONIZZANTE (tramite iC3b)
- FORMAZIONE DEL COMPESSO DI ATTACCO ALLA MEMBRANA (con attività citotossica diretta)

## IL COMPLEMENTO



### 1.1.3 I tipi cellulari dell'immunità innata

Le cellule canonicamente collocate nell'immunità innata sono:

- MACROFAGI
- NEUTROFILI
- CELLULE DENDRITICHE
- LINFOCITI NK

Negli ultimi anni si è scoperto che le cellule NK sono soltanto un rappresentante di una famiglia molto più grande e di difficile classificazione: alcuni parlano di linfociti naturali, nel cui gruppo sarebbero presenti anche i linfociti T naturali e linfociti B naturali. Questi, anche se vengono chiamati linfociti, possiedono caratteristiche peculiari, come l'espressione di recettori a bassa variabilità. I linfociti T classici hanno recettori ad alta variabilità delle subunità  $\alpha\beta$ , mentre i T naturali possiedono recettori con altre due catene  $\gamma\delta$  (anche nel caso in cui esprimono  $\alpha\beta$  sono sempre recettori a bassa variabilità).

Inoltre i linfociti T classicamente sono CD4+ o CD8+, alcuni T naturali non legano né MHC I né MHC II, altri sono solo CD8+, e altri che vengono chiamati NKT possono essere sia CD4+ che CD8+. Gli stessi linfociti B naturali, responsabili della produzione di anticorpi naturali, hanno anch'essi una scarsa variabilità dei BCR e una modalità di sviluppo diversa dai linfociti B tradizionali. Tuttavia sono molto importanti nella definizione dell'immunità mucosale. I linfociti T naturali sono i principali costituenti di quelli che si chiamano linfociti intraepiteliali. Nell'epitelio intestinale sono presenti questi linfociti a separare le cellule degli epitelii ed hanno la funzione di sentinelle, sentono l'ambiente della mucosa intestinale. Alcuni si localizzano nel fegato, altri nel sangue, altri localizzano nei linfonodi o milza. **Ciò che comunque li caratterizza è la bassa variabilità dei recettori e la capacità di risposta rapida tramite rilascio di citochine specifiche.**

Rispetto ai linfociti canonici che hanno bisogno di un riconoscimento che avviene tramite MHC, i linfociti naturali hanno attività citotossica (uccidono cellule bersaglio) a seguito di un'attivazione che non passa attraverso la presentazione di un antigene non-self.

Le cellule NK sono abili a riconoscere quelle cellule che non esprimono più l'MHC I. Il sistema dell'immunità adattativa, passando per l'MHC I, ha in sé una debolezza: qualora un virus o un batterio infetta una cellula impedendogli di esprimere MHC, quella cellula diventa "trasparente" per il S.I. Il linfocita T citotossico per riconoscere la cellula infettata deve "vedere" l'antigene portato sull' MHC I. Se, come molti patogeni, la strategia è quella di togliere l'MHC, allora il patogeno può continuare a proliferare nascosto nelle cellule. L' NK invece riesce a sorpassare questa difesa perché risponde ad altri tipi di segnalazione, ad esempio l'espressione da parte della cellula infettata di recettori di stress MICA. Il riconoscimento di un MHC che porta un peptide da parte di una cellula NK tramite un altro recettore KIR determina invece un segnale di inibizione sulla cellula NK. La cellula NK ha come finalità la sorveglianza dell'espressione degli MHC, e questo lo si evince anche dalla loro possibilità di riconoscere la sequenza leader degli MHC: l'MHC come le altre proteine viene prodotto a livello del reticolo endoplasmatico e perde una sequenza che va a veicolarlo a livello del reticolo. Si tratta del peptide leader che può essere esposto sulla cellula tramite un HLA di tipo E e viene riconosciuto dalla cellula NK come segnale inibitorio. La cellula che ha processato l'MHC e lo presenterà all'esterno invia il segnale che non ci

sono patogeni che interferiscono con il processamento dell'MHC. Questo è un'ulteriore riprova del fatto che l'immunità innata è complementare all'immunità acquisita.

Capitolo 2  
IMMUNITÀ ACQUISITA  
(LEZIONE 15-03-18)

Abbiamo visto che l'immunità innata si distingue da quella acquisita soprattutto per la tempistica: l'immunità innata agisce in tempi molto brevi (minuti, ore); mentre l'acquisita ha bisogno di più tempo, almeno a seguito della prima attivazione. L'immunità innata per riconoscere le molecole estranee ha bisogno di un repertorio di recettori prestabilito, che vengono acquisiti per via germinale, definiti **RECETTORI PREFORMATI**: l'immunità innata, perciò, si accontenta del riconoscimento di strutture generiche associate ai patogeni (PAMP) e lo fa attraverso un repertorio recettoriale limitato. L'immunità acquisita, invece, mette in atto un'altra strategia ovvero quella di riuscire a produrre dei recettori maggiormente adatti al bersaglio e potenzialmente a qualsiasi bersaglio non-self. Quindi non siamo più legati alla presenza di una particolare struttura della parete batterica, o a una certa catena di zuccheri espressa da un patogeno, e anche in presenza di un patogeno che non contenga tali strutture ripetute (PAMP) il sistema immunitario sarà comunque in grado di produrre recettori specifici.

I recettori che fanno funzionare l'immunità acquisita ricadono in 3 categorie: il **COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ (MHC) DI CLASSE I O DI CLASSE II**, gli **ANTICORPI**, il **RECETTORE dei LINFOCITI T (TCR)**.

- Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità: **MHC-I MHC-II**
- Gli anticorpi (comprendono il **BCR**, recettore dei linfociti B);
- Recettori dei linfociti T: **TCR**.

La possibilità di riconoscere, di modulare il proprio recettore di volta in volta a seconda dell'antigene da riconoscere richiede la necessità di poter contare su una alta variabilità di queste strutture: i recettori perciò non vengono acquisiti nella forma definitiva per via germinale, ma devono poter essere **RICOMBINATO** nell'adulto. Questo vale per il **BCR** e per il **TCR**, ed infatti da una prima osservazione della loro struttura risulta che entrambi presentano una zona variabile intesa come una porzione a sequenza aminoacidica modificabile che ha la capacità di riconoscere tanti antigeni diversi.

[Il **TLR4** riconosce **LPS**, il **BCR**, nelle sue diverse versioni, riconosce tantissimi antigeni diversi] Un **BCR** può presentare fino alla  $10^{14}$  sequenze diverse nel dominio variabile. Il termine **IDIOTIPO**, caratterizza la sequenza della regione variabile, perciò ad ogni regione variabile corrisponde potenzialmente una capacità di riconoscimento di un antigene diverso.  $10^{14}$  è un numero elevatissimo di antigeni riconosciuti, numero molto difficile da ottenere nel caso di recettori

preformati. Il TCR presenta caratteristiche strutturali simili, ovvero ha una regione variabile che può potenzialmente essere espressa in  $10^{18}$  sequenze aminoacidiche diverse.

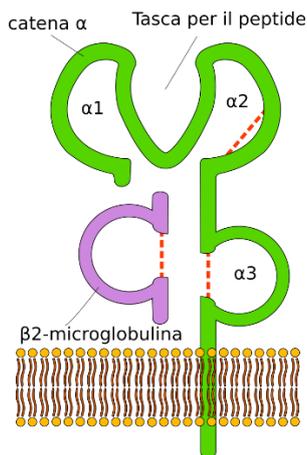
Questa alta variabilità è ottenuta attraverso il processo della RICOMBINAZIONE. Quindi partendo da una base genetica germinale e uguale per tutti i linfociti T e B, nella maturazione di questi linfociti saranno scelte porzioni geniche diverse per andare a costituire la componente variabile: a seconda della porzione scelta si otterrà un recettore diverso. Vedremo come per il BCR oltre a questa variabilità acquisita dalla ricombinazione genica, è presente un'altra tipologia sorgente di variabilità, l'INTRODUZIONE DI MUTAZIONE nei geni codificanti, ma questo avviene non nella fase di maturazione del linfocita, ma nella fase di attivazione della plasmacellula: questo processo viene definito IPERMUTAZIONE SOMATICA e serve per rendere ancora più efficaci gli anticorpi che vengono prodotti. Quindi la variabilità è definita sulla base di PROCESSI GENETICI, SOMATICI, che prevedono la ricombinazione di porzioni diverse dei locus genici in fase di maturazione dei linfociti B e T. In particolare la ricombinazione somatica della porzione variabile di un anticorpo è attuata dalla fusione combinatoria di una regione V, di una D e di una J scelta casualmente da un ampio repertorio presente nel locus genico. Gli enzimi che si occupano di tale processo sono le ricombinasi RAG1 e RAG2. La variabilità è ottenuta oltre che dalla combinazione casuale delle sequenze anche dall'introduzione nucleotidi extra nelle regioni di fusioni tra le sequenze ricombinate.

L'MHC, al contrario, non è soggetta a ricombinazione, bensì si basa su altri due fenomeni per arricchire il numero di recettori disponibili: la POLIGENIA e il POLIMORFISMO. L'MHC è sicuramente, di gran lunga, il sistema che presenta la maggiore percentuale di polimorfismi conosciuta (esistono migliaia di alleli diversi, nessun'altra proteina presenta un polimorfismo così alto).

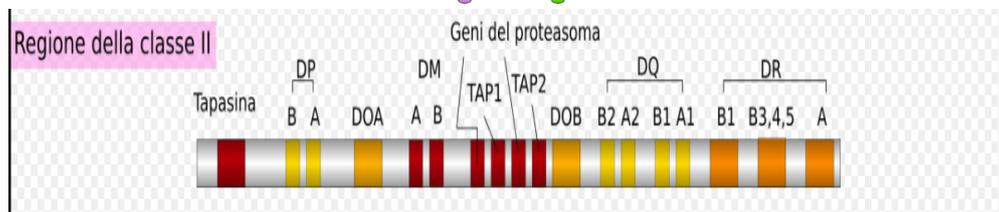
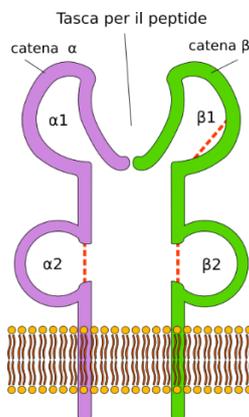
## 2.1 MHC

MHC nell'uomo prende il nome di HLA, MHC-I è formato da una catena alfa con tre domini associato ad una proteina diversa che non interviene nel processo di legame del peptide, la beta-2-microglobulina; MHC-II invece è formata da una catena alfa e una beta, che contribuiscono entrambe nella formazione della tasca di legame.

Con il termine POLIGENIA si intende che non vi è un unico gene che codifica per le strutture dell'MHC, ma che all'interno dei loci vi possono essere più geni deputati per la generazione della stessa proteina.

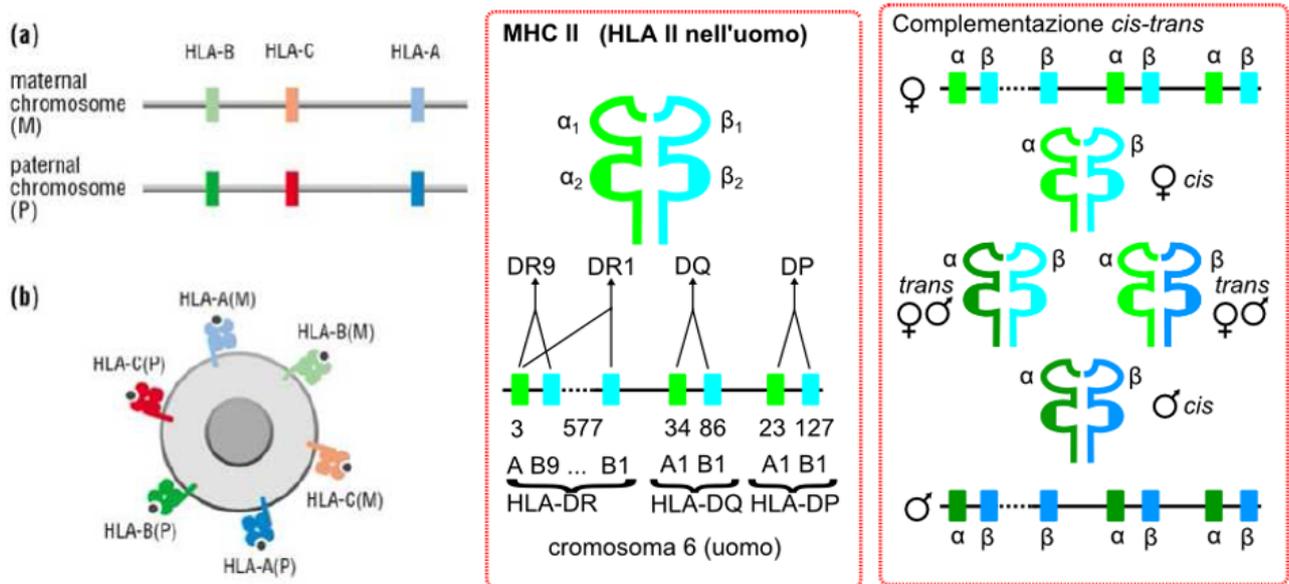


Ad esempio per l'MHC I all'interno del locus genico vi sono tre geni che possono codificare per la catena alfa, i geni A, B e C, 3 di questi geni localizzati sul cromosoma materno e 3 sul cromosoma paterno. Questo conferisce un vantaggio in quanto possono essere tradotti 6 diversi recettori. Tale fenomeno non produrrebbe variabilità se non fosse accoppiata ad un'altra caratteristica fondamentale, il POLIMORFISMO. Se non vi fosse il polimorfismo si otterrebbero 6 recettori tutti uguali, in realtà considerando che vi sono centinaia di alleli (forme alternative di uno stesso gene) è molto probabile che ogni individuo abbia 6 recettori diversi da quelli di un altro individuo (le combinazioni fra le diverse forme alleliche materne e paterne portano ad un numero enorme di possibili combinazioni differenti in individui diversi).



Discorso analogo per l'MHC di classe II, ma il livello di variabilità diviene più complesso in quanto ci troviamo di fronte a due catene polipeptidiche che formano la tasca di legame e un assetto genetico molto più elaborato: vi sono 3 regioni DR, DQ e DP (dove D indica la classe II e P, Q, R la famiglia di geni) e ognuna di queste regioni codifica sia per la catena alfa che beta. Mentre nel DQ e DP abbiamo un gene per alfa e per beta, nel DR abbiamo tanti geni che

codificano per la catena beta. La cosa che aumenta ancor di più la variabilità è che un alfa materno si può legare un beta paterno: questa forma di variabilità viene definita **COMPLEMENTAZIONE CIS/TRANS**, che porta ad una variabilità effettiva del recettore molto ampia. Nell'MHC di classe II la porzione di legame è formata da ambedue le catene, entrambe perciò partecipano alla variabilità.



Questa variabilità è alla base della problematica dell'incompatibilità di trapianto: è altamente improbabile che due individui presi in una popolazione siano compatibili come MHC. Gli MHC non sono altro che proteine self, perciò quando introduco un MHC di un altro individuo io inserisco un non-self che viene subito riconosciuto per questa differenza polimorfica. Si possono adottare delle strategie per rendere possibili i trapianti e una delle metodiche alla base di questi processi è proprio la tipizzazione, la caratterizzazione del HLA. Proprio per le esigenze cliniche dei trapianti è molto importante applicare quella che si chiama **TIPIZZAZIONE HLA**: cioè individuare quali antigeni HLA appartengono ad un individuo. Il primo metodo utilizzato per la tipizzazione era basato sull'analisi sierotipica, ovvero venivano utilizzati degli anticorpi capaci di legare proteine HLA diverse. Gli anticorpi presentano una caratteristica specifica di riconoscimento: prelevando delle cellule dal sangue era possibile identificare e legare attraverso gli anticorpi i diversi MHC. Da un po' di tempo è preferita l'analisi genotipica: date le moderne tecnologie è possibile risalire alla sequenza nucleotidica che codifica per l'MHC, dando origine ad una descrizione più particolareggiata e precisa. Il metodo basato sul genotipo è più sicuro in quanto nel caso del sierotipo vado a basarmi sul legame anticorpo/epitopo, mentre nel caso del genotipo vado a leggere direttamente la sequenza nucleotidica che codifica per quella proteina.

La tabella mostra la corrispondenza che esiste tra genotipo e sierotipo: Un sierotipo può corrispondere a più genotipi: nel sierotipo A1 ricadono più alleli, più genotipi: es. il sierotipo A1

comprende 3 forme alleliche diverse che riesco a distinguere solo facendo il genotipo. In questo caso anche se cambia un'unica base io riesco attraverso l'analisi genotipica a riconoscere un nuovo allele, che invece poteva essere legato da un unico anticorpo data la variazione molto sottile e poco rilevabile dalla struttura. Trovandoci di fronte a migliaia di alleli dobbiamo servirci di una specifica nomenclatura per la loro identificazione: il codice di tipizzazione inizia con "HLA", poi segue l'individuazione della classe indicata dalle lettere **A/B/C** (classe I) o **DQ/DP/DR** (classe II), a cui segue l'individuazione della catena **A** per alfa e **B** per beta e del **numero del gene** nel caso dell'MHC di classe II (es. B1, dove B identifica la catena beta e 1 il gene; vedi in figura); poi vi è un **asterisco** di separazione, e di seguito il **numero di riconoscimento dello specifico allele** (es. 2702; vedi in figura).

## NOMENCLATURA HLA

SIEROTIPO: HLA riconosciuto da uno specifico anticorpo

GENOTIPO: sequenza nucleotidica dell'allele

SUPERTIPO: famiglia di alleli che legano gli stessi peptidi

Genotype	Serotype	Supertype
A*01	A1	
A*0101	A1	A1
A*0102	A1	A1
A*0201	A2	A2
A*01011, A*02012		
A*0202	A2	A2
A*0203	A203	A2
A*0204	A2	A2

DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	
DQA1*0102/DQB1*0602	DQ6(1)	
DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3)	
DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8(3)	
DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	
DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	
DQB1*0201	DQ2	
DQB1*0203	DQ2	
DQB1*0301	DQ7(3)	

HLA-B\*2702  
 ↳ CLASSE I (A-B-C)  
 ↳ ALLELE

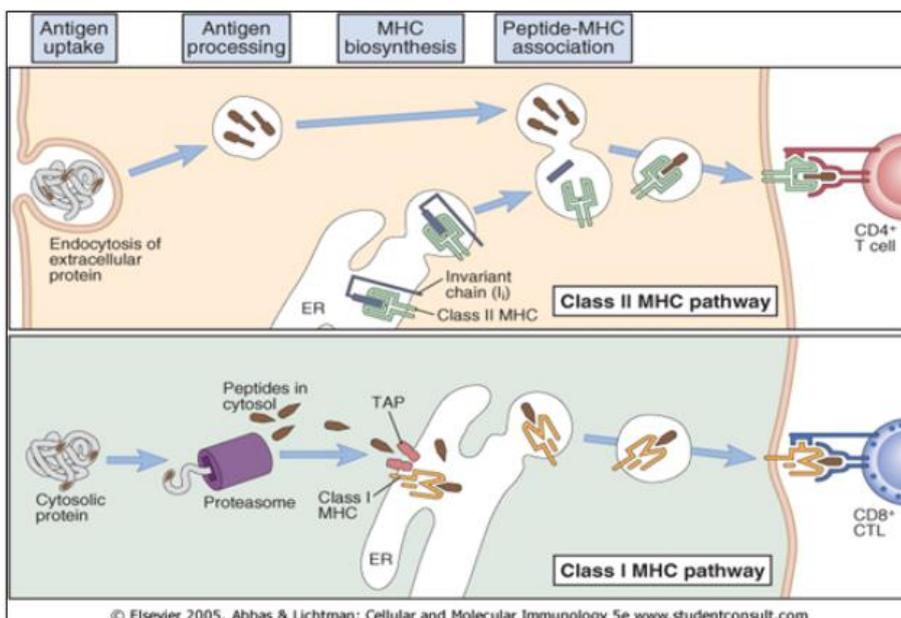
HLA-DRB1\*0401  
 ↳ CLASSE II (P-Q-R)  
 ↳ GENE SUBUNITA' (A-B)  
 ↳ ALLELE

Immunità acquisita

### 2.1.1 Funzione dei recettori MHC

Il ruolo svolto da MHC nel sistema dell'immunità acquisita si realizza sin dalle prime fasi dell'attivazione della sua attivazione, per poi accompagnare tutto lo svolgimento dell'immunità acquisita. L'MHC rappresenta un meccanismo attraverso cui l'immunità innata e l'immunità acquisita comunicano. La finalità dell'utilizzo del MHC è quella di rendere visibile alle cellule

dell'immunità adattiva (linfociti T e B) dei frammenti antigenici di pochi aminoacidi. Svolge perciò una funzione di sorveglianza: è quel fenomeno che guida l'attivazione iniziale dell'immunità acquisita. Questo tipo di sorveglianza avviene sia per antigeni INTRACELLULARI che EXTRACELLULARI. L'MHC di classe II prevede che a valle dell'endocitosi di una proteina extracellulare vi sia la formazione del FAGOLISOSOMA, con la digestione dell'antigene all'interno della vescicola in tanti peptidi, che possono essere caricati sull'MHC II, che viene assemblato nel reticolo endoplasmatico. In seguito, perciò solo dopo che l'MHC II viene caricato con questo frammento può essere esposto sulla superficie cellulare. Importante è perciò ricordare che l'MHC II viene esposto solo quando è legato ad un peptide prelevato dall'ambiente extracellulare, perciò non vi sono MHC canonici esposti senza proteine legate. La funzione di monitoraggio della funzione intracellulare prevede che il continuo turn-over delle proteine all'interno di una cellula venga saggiato attraverso il recupero dei peptidi in seguito a degradazione (da parte del proteosoma), caricati sull'MHC di classe I ed esposti sulla superficie cellulare. In questo modo l'MHC è in grado di monitorare la situazione antigenica esterna, ma anche quella interna, potendo individuare anche la presenza di microrganismi intracellulari (quali virus) che esprimeranno proteine non-self che verranno caricate sul MHC di classe I, fornendo la possibilità a linfociti T e B di “vedere” gli antigeni non-self.



Queste funzioni diversificate dei due complessi di istocompatibilità ne determinano anche una differente localizzazione cellulare: l'MHC di classe I è espresso su tutte le cellule del nostro corpo, tranne che sugli eritrociti (questo perché il monitoraggio del turn-over proteico avviene ovviamente in tutte le cellule); mentre l'MHC di classe II viene esposto solo da quelle specie cellulari che presentano un'attività fagocitaria ovvero cellule quali macrofagi e cellule dendritiche, Inoltre anche i linfociti B usano MHC II nel loro processo di attivazione in plasmacellule, per comunicare con i linfociti T.

## 2.2 Presentazione dell'antigene

La cellula dendritica è l'esempio perfetto di cellula presentante l'antigene, ovviamente espone sulla propria superficie sia l'MHC di classe I che di classe II: è la cellula chiave che ha il compito primario dell'attivazione dei linfociti T. Le cellule dendritiche sono diffuse in tutto il corpo soprattutto in posizioni strategiche quali sotto la cute o nelle mucose, nel momento in cui ricevono un segnale pro-infiammatorio e acquisiscono materiale non-self migrano verso gli organi linfoidi periferici dove hanno il compito di attivare i linfociti T contro il materiale non-self, che si è introdotto all'interno dell'organismo. Questo è un processo complesso che non deve avvenire se non proprio necessario. Nel momento in cui una cellula dendritica prende contatto con un linfocita T nel linfonodo non basta soltanto il contatto attraverso un recettore ma si deve creare una vera e propria adesione stretta e specifica tra le due cellule (elevata regolazione del processo), che prende il nome di SINAPSI IMMUNOLOGICA. Si instaurano perciò una serie di comunicazioni nei due sensi, un vero e proprio colloquio tra cellula dendritica e linfocita.

L'attivazione dell'immunità acquista parte sempre dall' MHC di classe II che espone il peptide non-self al recettore dei linfociti T, il TCR, recettore ad elevata variabilità dei linfociti T. Il TCR non è in realtà un recettore ma un complesso recettoriale, che non ha capacità di trasmissione della comunicazione intra-citoplasmatica, ma diviene capace di trasmettere il segnale solo quando è in associazione con altri corecettori. Infatti questo complesso riesce a legarsi al MHC solo in presenza di un appropriato co-recettore, che può essere il corecettore CD4 o CD8, il CD4 permette il legame con l'MHC di classe II, il CD8 permette il legame con MHC di classe I: si forma così una specie di morsa in cui da una parte il TCR riconosce l'MHC e il peptide, dall'altro il CD8 (o il CD4), riesce a riconoscere una porzione che non lega il peptide del MHC: questo è il motivo per cui i linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup> riconoscono l'MHC di classe I, attivando subito la loro risposta effettrice dopo il colloquio, mentre i linfociti T helper CD4<sup>+</sup> riconoscono l'MHC di classe II, dovendo svolgere una funzione differente che non è quella diretta ma di aiutante, riuscendo a orchestrare la risposta immunitaria. La cellula dendritica porta il peptide non-self sull'MHC, questo, se rinforzato da alcune proteine di segnalazione (segnale di allarme) come quelle della famiglia B7 (riconosciute anche queste a livello di recettori presenti su linfociti T, recettori CD28), attiva il linfocita T (sia esso helper o citotossico). Questa prima attivazione non è sufficiente affinché il linfocita venga completamente attivato ma vi devono essere una serie di co-segnalazioni tra le due cellule per portare alla formazione di un linfocita effetttore: in questa fase le due cellule attraverso l'esposizione di recettori e ligandi di segnalazione incominciano a rimbalzarsi informazioni dando origine ad una vera e propria comunicazione cellulare, una serie di checkpoint successivi fino alla attivazione definitiva del linfocita T. Il linfocita T che si attiva è quello che riconosce il peptide, esposto sull'MHC II e quindi scatenerà una risposta proprio verso questo peptide e l'antigene in cui è contenuto.

Negli ultimi anni si è dato risalto ad un altro evento che accade contestualmente all'attivazione dei linfociti T: vengono esposti anche dei recettori da parte del linfocita T (come PD1 e CTLA4) che hanno però una funzione soppressiva: non contribuiscono all'ulteriore attivazione, bensì se attivati dagli opportuni ligandi sono in grado di bloccare l'attività del linfocita. Questa cosa è stata un po' sottovalutata finché negli ultimi tempi grazie all'avanzamento degli studi dell'immunologia

tumorale si è scoperto che questi meccanismi sono proprio quelli sfruttati dal tumore per smorzare la risposta del sistema immunitario e vengono oggi chiamati CHECKPOINT IMMUNOLOGICI. Vedremo che oggi molte delle terapie tumorali mirano proprio a sorpassare questi checkpoint immunologici. Ancora non è molto chiaro ma sicuramente uno dei motivi per cui vengono attivate queste segnalazioni soppressive a valle è per rendere la risposta immunitaria transitoria, impedendo che una risposta prolungata possa diventare dannosa. Una volta che è avvenuta l'attivazione del linfocita T effetore questo torna ovviamente al sito di infezione dove è necessario il suo intervento: nel momento in cui arrivano nel tessuto la produzione di alcuni fattori quali l'interferone gamma, tramite la stimolazione dell'espressione di PDL1 sui macrofagi porta ad una soppressione dell'attività linfocitaria dopo legame con PD1. Quindi sono dei freni che vengono attuati in periferia alla risposta del sistema immunitario acquisito. Possono essere considerati anche come meccanismi di tolleranza periferica.

### **2.2.1 Linfociti T helper (Th)**

L'attivazione dei linfociti può determinare il differenziamento verso diverse popolazioni. Tale fenomeno è determinato dal contesto paracrino in cui avviene l'attivazione. A seconda delle condizioni i linfociti Th si possono differenziare in linfociti Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Th follicolari ( $T_{FH}$ ). Ognuna di queste sottopopolazioni svolge funzioni non completamente sovrapponibile a quelle delle altre. Il nome helper sta ad identificare che si tratta di linfociti che non prendono direttamente parte alla distruzione dell'agente patogeno, ma fungono da AIUTANTI per l'attivazione e la risposta di altre cellule. Tale funzione si può esplicitare nella produzione di citochine specifiche (Th17 : IL-17; Th22 : IL-22). I linfociti  $T_{FH}$  sono quelli che aiutano nella maturazione dei linfociti B in plasmacellule nei follicoli, i Th1 determinano l'attivazione macrofagica, mentre i Th2 attivano la degranulazione di eosinofili e basofili. Una particolare sottopopolazione dei Th è rappresentata dai Treg. Questi sono linfociti Th anomali perché sono immunosoppressivi, e provengono dal timo come autoreattivi (riconoscono antigeni self). I linfociti Treg una volta attivati rilasciano citochine anti-infiammatorie TGF $\beta$  e IL-10.

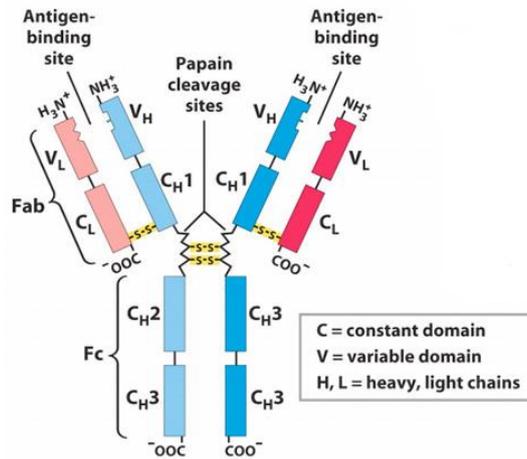
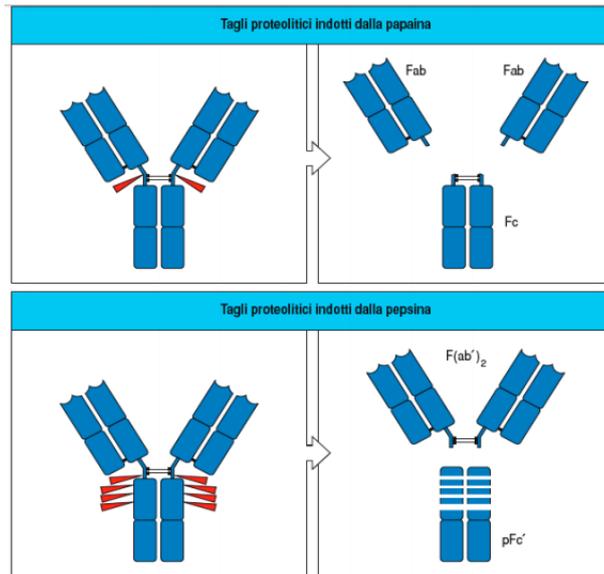
## **2.3 Linfociti T citotossici**

Tra i linfociti T vi sono anche i linfociti T citotossici (CD8+) che presentano una differente modalità di attivazione: possono essere attivati anche essi dalla cellula dendritica attraverso l'MHC di classe I, ma si è visto che in molti casi questa attivazione, ha bisogno di una contemporanea attivazione di un linfocita T Helper, oppure possono essere attivati direttamente. Ambedue i processi portano comunque al differenziamento in linfocita Tc effetore, che è un soldato, attivato per distruggere i bersagli. Quindi la cellula dendritica seleziona i linfociti T citotossici che riconoscono l'antigene associato all'agente patogeno, quindi nel momento in cui c'è stata l'attivazione ci sarà una proliferazione di linfociti citotossici che andranno alla ricerca di quegli antigeni in giro per il corpo e quando li troveranno esposti dagli MHC-I delle cellule uccideranno quella cellula bersaglio. Perciò, inizialmente ho pochi linfociti T citotossici che riconoscono una molecola in particolare e poi per avere una risposta efficace questi devono proliferare (sarebbe impossibile avere già un numero adeguato preformato), e quindi proprio per questo motivo l'immunità acquisita non può rispondere immediatamente, perché ci deve essere una fase di attivazione, una fase di proliferazione

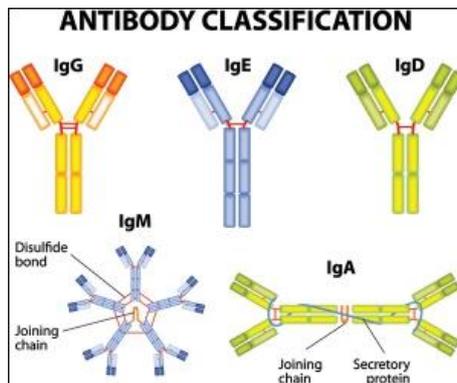
e poi l'effettivo funzionamento. Il linfocita T citotossico attivato riesce a scovare in periferia le cellule infette, riconoscendo lo stesso peptide che gli è stato presentato dalla cellula dendritica: scova questo peptide non self e distrugge per via apoptotica la cellula bersaglio. L'apoptosi può essere indotta sia tramite l'esposizione del recettore FAS o tramite la degranolazione di perforine e granzimi (enzimi simili a caspasi endocellulari) che riproducono le fasi del processo apoptotico (processo di morte indolore da parte dell'organismo).

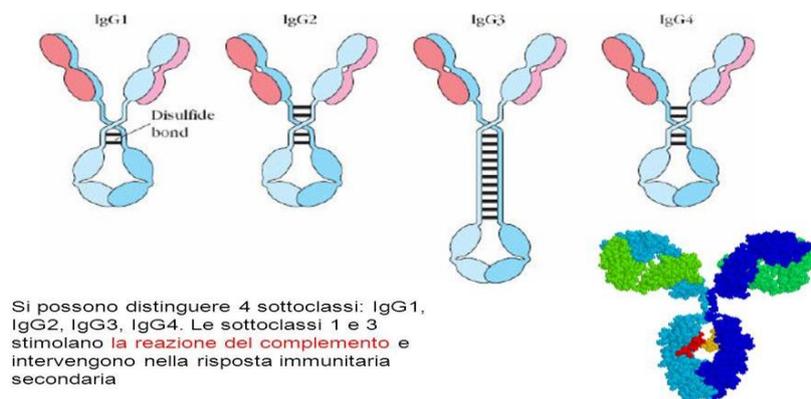
## 2.4 Linfociti B ed anticorpi

I linfociti B hanno come strumento di attacco la produzione di anticorpi. Gli anticorpi hanno tutti una struttura comune: presentano 2 catene leggere (L) e 2 catene pesanti (H) tenute insieme da legami disolfuro; anche le catene H tra di loro sono tenute unite da ponti disolfuro, nella regione che viene definita la **regione cerniera** (regione che permette la mobilità relativa dei frammenti Fab). Ogni monomero anticorpale presenta due regioni di legame degli antigeni. Le catene H ed L sono caratterizzate dalla presenza di una regione costante ed una regione variabile. La variabilità del legame è governata dalla variabilità aminoacidica delle regioni ipervariabili (regioni che determinano la complementarietà CDR) determinando la specificità anticorpale per un determinato epitopo (idiotipo).



Gli anticorpi vengono suddivisi in 5 isotipi o classi in base alla struttura della catena pesante: IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE. Vengono definite in quest'ordine in base alla concentrazione presente nel siero: la maggior parte delle immunoglobuline nel sangue sono IgG (80%), seguite dalle IgA nella forma monomerica, IgM nella forma pentamerica (6%), IgD (0,1%) ed IgE (0,002%). Altra caratteristica importante è che le IgG contengono 4 sottoclassi IgG1-2-3-4, dove le più abbondanti sono le IgG1 e le IgG2, le differenze sono per lo più a livello strutturale: nelle IgG3 abbiamo una regione cerniera molto allungata (conferisce flessibilità all'anticorpo).





Le IgA sono presenti nella forma monomerica nel siero ma sono conosciute soprattutto nella forma dimerica, che è la forma di secrezione ed infatti è l'immunoglobulina secreta per proteggere le mucose. Le IgG non attraversano gli epiteli o le mucose, invece lo fanno molto bene le IgA, ma nella loro forma dimerica. Le IgM presentano un'inconfondibile struttura pentamerica a stella, ma possono essere anche legate alla membrana a formare il BCR. Il BCR può essere o di classe IgM o di classe IgD (sono gli unici conosciuti); l'IgD svolge quasi esclusivamente questa funzione di BCR. L'IgE costituisce un'eccezione per vari motivi ed è un'immunoglobulina che viene utilizzata e prodotta con poca frequenza nel sistema immunitario. Una cosa importante è l'emivita nel siero di questi anticorpi: 23 giorni per le IgG, 6 giorni per le IgA, 5 giorni per le IgM, 3 giorni per le IgD, 2 giorni per le IgE.

### 2.4.1 Produzione degli anticorpi

Gli anticorpi sono divenuti, non solo nell'ambito della ricerca ma soprattutto nell'ambito della clinica, uno strumento fondamentale ed indispensabile, a livello terapeutico, diagnostico e a livello investigativo. Perciò interessante è analizzare come vengono prodotti questi anticorpi che poi utilizziamo per vari scopi.

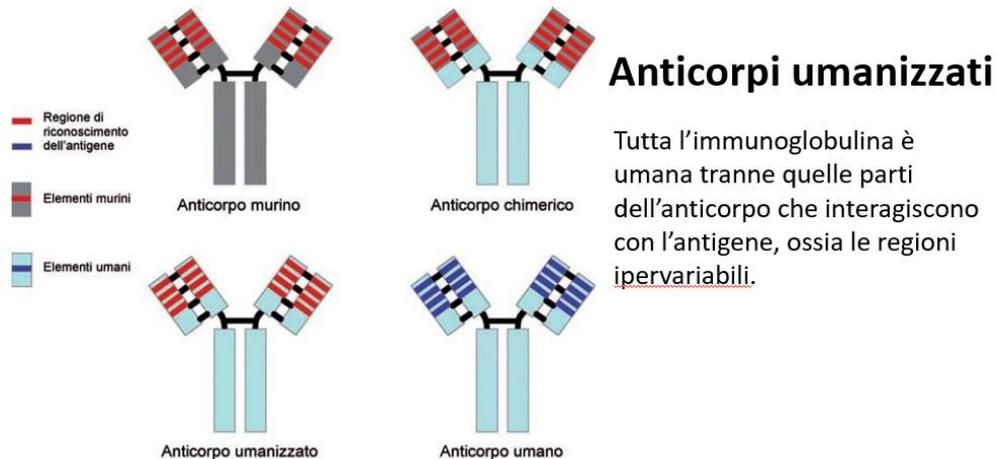
- 1) Il processo più basilare di produzione parte dall'individuazione di una animale, di solito un coniglio (o anche capre, maiali, ratti) e viene sfruttato per produrre anticorpi utili: chiaramente a monte ci deve essere un processo che conferisca effettivamente l'antigene che il sistema immunitario dell'animale deve riconoscere, vi deve perciò essere un processo preventivo di purificazione dell'antigene. Una volta purificato l'antigene (non-self) viene perciò inoculato nel coniglio e il sistema immunitario viene stimolato a produrre anticorpi contro questo antigene non-self. Una volta avvenuto l'inoculo devono passare minimo altre 2 settimane perché venga montata la risposta anticorpale da parte del sistema immunitario. Dopo queste due settimane, viene raccolto il sangue del coniglio e vengono purificati gli anticorpi presenti: gli anticorpi che vengono purificati saranno prevalentemente della classe delle IgG, una quota minore di IgM. Importante è porre l'attenzione su che forma di antigene

è stata iniettata: se è stato iniettata una proteina grande e completa il sistema immunitario del coniglio produrrà tanti anticorpi che riconosceranno tutti i possibili epitopi di quell'antigene, questo tipo di anticorpi che vengono purificati vengono definiti **POLICLONALI** (pool di anticorpi a diverso idiotipo), in quanto sono prodotti da più cloni di linfociti B.

- 2) Se invece non voglio ottenere un pool di anticorpi policlonali, bisogna adottare un metodo più complesso che si serve di colture cellulari, in cui immunizzo un topo (ora possibile anche con conigli) con l'antigene di interesse. Dopo l'inoculazione e un periodo di 2 settimane, necessario per il sistema immunitario per portare alla produzione di plasmacellule, quest'ultime vengono isolate (dalla milza) e vengono fatte crescere in coltura: posso far crescere in un pozzetto anche una sola plasmacellula della mia coltura così ho la produzione di un anticorpo **MONOCLONALE**. In questo caso però sorge un problema in quanto la plasmacellula, il linfocita B attivato, non è più proliferante, perciò non riesco a produrre una quantità di anticorpi elevata. Questa problematica viene risolta attraverso la formazione di un **IBRIDOMA** della plasmacellula con una particolare cellula che conferisce l'attività proliferante, le cellule di **MIELOMA**: il mieloma è un tumore delle cellule B che conferisce all'ibridoma una capacità proliferativa illimitata. Perciò da questa procedura otterrò una grande quantità di anticorpi monoclonali da poter utilizzare.
- 3) Oggi si usa ampiamente la tecnologia ricombinante: vengono utilizzati batteri e batteriofagi e la procedura prevede, partendo sempre da un animale, l'immunizzazione con un antigene, dopo di che si prelevano i linfociti B, ma in questo caso invece di sottoporli immediatamente alla fusione con cellula tumorale per formare l'ibridoma, si vanno a recuperare le sequenze di DNA ricombinate. Il BCR che porta il linfocita B è frutto di una ricombinazione genetica, perciò se conosco la sequenza di quella regione posso risalire alla ricostruzione dell'anticorpo a partire dalla sequenza nucleotidica. In questo caso attraverso le tecniche di DNA ricombinante riuscirò a far produrre non più da un linfocita B, ma da un batterio (o virus) la porzione o l'anticorpo che mi interessa per poi utilizzarlo. In questo modo si ottengono anticorpi monoclonali molto specifici e chimerici o umanizzati: l'efficacia terapeutica degli anticorpi, con l'utilizzo di questa tecnica, si è elevata notevolmente, così come si è abbassato il rischio di rigetto.

## Anticorpi chimerici

Le regioni variabili degli anticorpi murini sono fuse con le regioni costanti di un anticorpo umano: L'anticorpo chimerico conserva la specificità di legame ma somiglia maggiormente ad un anticorpo umano naturale.



### 2.4.2 Descrizione della funzione di un anticorpo

L'anticorpo viene prodotto dal linfocita B per:

- la **NEUTRALIZZAZIONE**: l'anticorpo va a legare lo specifico antigene complementare presente sull'agente patogeno, ma può anche essere una tossina, bloccandone l'attività tossica;
- l'**ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO**: il sistema del complemento viene attivato attraverso la via classica che prevede un legame con l'anticorpo per avviare l'attivazione della cascata, che prevede 3 effetti: lisi, opsonizzazione, infiammazione.

Queste sono le funzioni più intuitive ed immediate degli anticorpi ma ve ne sono altre più articolate. Già l'**OPSONIZZAZIONE** per favorire la fagocitosi e la **CITOTOSSICITA' DIPENDENTE DA ANTICORPI (ADCC)** sono dei processi che prevedono la presenza di un recettore intermedio e questo aspetto spesso viene trascurato: il macrofago per riconoscere l'antigene legato all'anticorpo ha bisogno di riconoscere l'anticorpo stesso, lo stesso vale per la citotossicità dipendente da anticorpi, ci deve essere un recettore tra l'anticorpo e la cellula effettrice. La porzione anticorpale che svolge la funzione di riconoscimento è la porzione **Fc**, la porzione costante dell'anticorpo. Chiaramente il dominio più importante dell'anticorpo è quello variabile, quello che effettivamente va a riconoscere l'antigene, ma anche la porzione costante ha la sua importanza, in quanto è la porzione che viene riconosciuta in molte delle funzioni svolte dall'anticorpo. Esistono tanti recettori delle Fc: la denominazione è sempre la sigla Fc, seguita da una lettera greca che identifica la classe di anticorpo che viene riconosciuta, R e poi vi può essere un codice identificativo (Fc $\gamma$ R1).

- $\gamma$  identifica la classe delle IgG
- $\alpha$  identifica la classe delle IgA
- $\epsilon$  identifica la classe delle IgE

Il riconoscimento è perciò specifico per una classe, al massimo un recettore può essere in grado di riconoscere più immunoglobuline all'interno della stessa classe, ma mai una immunoglobulina di classe differenti in quanto sono specifici. Molte sono le cellule che esprimono questi recettori, come macrofagi, neutrofili, eosinofili, mastociti, cellule dendritiche ecc.: nei macrofagi e neutrofili essendo fagociti, l'espressione del recettore Fc serve per fagocitare a valle del riconoscimento anticorpo-antigene-anticorpo-FcR; eosinofilo non fa fagocitosi, però presenta all'interno del citoplasma dei granuli, perciò il legame a valle determina una degranulazione; il recettore FcεR1 per esempio è espresso unicamente da mastociti, eosinofili e basofili (questo spiega molto delle reazioni allergiche): sono queste le cellule che esprimono potenziali recettori per le IgE. Gli FcR non solo aiutano nella fagocitosi e nella trasmissione del segnale ma svolgono anche una funzione diversa che è quella di permettere l'attraversamento degli epitelii e delle mucose degli anticorpi, TRANSCITOSI DEGLI ANTICORPI. In questo senso sono 2 gli FcR importanti:

- PIGR permette il passaggio delle IgA (in parte anche alle IgM) attraverso le mucose dalla base al lume: questo è il caso in cui le IgA divengono secretorie.
- FcRn che lega le IgG. L'espressione di questo recettore è molto variegata in quanto lo troviamo, nei macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche, ma anche in cellule che hanno a che fare molto meno con il sistema immunitario, come le cellule endoteliali, gli epatociti e le cellule epiteliali dell'intestino neonatale (n: sta per neonatale). Al contrario del PIGR, il trasporto avviene al contrario dal lume dell'intestino verso la parte basale: l'FcRn lega ad un certo PH, di solito più basso di 7, le IgG nel lume e le trasporta alla base cellulare dove le rilascia ad un pH di circa 7,4 (ha un funzionamento legato alle variazioni di pH). Questo tipo di recettore è probabilmente anche quello che aumenta l'emivita delle IgG nel sangue: essendo espresso anche dalle cellule endoteliali è come se nascondessero le IgG dalla degradazione. Un meccanismo importante di questo recettore è svolto nel neonato: nel neonato questi trasportatori servono ad assorbire le immunoglobuline della madre, perciò è un processo in cui l'immunità viene trasferita dalla madre al neonato, proprio perché vi sono a livello delle mucose intestinali questi recettori che legano le immunoglobuline presenti nel lume e, con un processo di transitosi, le riversano nel circolo sanguigno.

### 2.4.3 Attivazione dei linfociti B



Nel linfonodo possiamo distinguere due porzioni ben definite in cui risiedono cellule diverse: nella paracorticale sono localizzati i linfociti T, nella corticale i linfociti B. La cellula dendritica arriva al linfonodo attraverso il vaso linfatico afferente (a partire da uno stato infiammatorio segue il flusso linfatico e arriva necessariamente al linfonodo) e svolge un ruolo importante nell'attivazione dei linfociti T CD4 nella paracorticale. Una delle sottopopolazioni dei linfociti T Helper, che si generano dall'attivazione dei linfociti T, è la TH-follicolare: questi  $T_{FH}$  migrano verso la regione corticale e si vanno a posizionare nei follicoli, delle porzioni specifiche di attivazione dei linfociti B. Qui la cellula TH-follicolare incontra un linfocita B che ha già avuto una storia, un linfocita B non completamente naïve, che ha perciò subito già una PREATTIVAZIONE. Oltre alle cellule dendritiche nel linfonodo arrivano anche antigeni drenati dalla linfa nel sito infiammatorio: questi antigeni, o interi patogeni, vengono riconosciuti dal BCR. A valle di questo riconoscimento BCR-antigene vi è endocitosi con internalizzazione e distruzione dell'antigene o del microbo con l'esposizione dell'antigene sull'MHC di classe II. Perciò questo è già un processo di preattivazione, ma non sufficiente per l'attivazione completa del linfocita: è necessario che avvenga il passaggio di presentazione dell'antigene dal linfocita TH al linfocita B. Anche in questo caso ci troviamo di fronte ad un COLLOQUIO tra due cellule, una sorta di sinapsi immunologica, in cui "parlano" un linfocita  $T_{FH}$  e un linfocita B anche qui vi sono una serie di checkpoint incrociati che portano come risultato finale alla formazione di una PLASMACELLULA. In casi particolari l'attivazione completa della plasmacellula può avvenire senza l'intervento dei linfociti T. In questo caso si parlerà di attivazione T indipendente (TI). Questa è possibile solo per alcuni tipi di antigene tra cui LPS e alcune catene zuccherine, che vengono quindi detti antigeni TI. L'altra differenza sostanziale è che queste plasmacellule producono solo IgM, quelli che vengono chiamati anche anticorpi naturali, in quanto sono presenti indipendentemente dall'aiuto dei linfociti T.

La maturazione che avviene grazie al colloquio tra cellula follicolare e linfocita B porta a plasmacellule che incominciano immediatamente a svolgere la loro funzione e normalmente la prima classe anticorpale che viene prodotta sono le IgM (il picco aumenta nel siero subito dopo l'attivazione). Sempre nel centro germinale vi è un'ulteriore maturazione delle plasmacellule che

da una parte prevede il CAMBIAMENTO DI CLASSE, la plasmacellula non produrrà solo IgM ma anche altre classi di Ig (es. IgE in caso di una reazione allergica), e l'IPERMUTAZIONE SOMATICA. Il sistema immunitario perciò non si accontenta degli anticorpi e dei linfociti B di cui già dispone, ma cerca di rendere gli anticorpi ancora più specifici per il bersaglio e questo lo fa con la generazione di mutazioni puntiformi nella porzione variabile degli anticorpi: in maniera casuale vengono introdotte queste mutazioni, viene riespresso il BCR sulla membrana, viene vagliato dal linfocita T<sub>FH</sub> o dalle cellule dendritiche presenti nel follicolo (per saggiarne la specificità).

- Se l'anticorpo ha una maggiore affinità per l'epitopo verrà selezionato positivamente e perciò la cellula B matura prolifererà dando origine a più plasmacellule, dando così origine ad un maggiore quantitativo di anticorpo specifico.
- Se l'anticorpo ha una minore affinità per l'epitopo verrà selezionata negativamente la plasmacellula e viene mandata a morte attraverso un processo apoptotico.

Quello che succede è una sorta di selezione naturale gli anticorpi e delle plasmacellule.

Alla fine di questo processo la risposta massima che l'organismo può dare sono anticorpi di classi IgG, IgA e IgE e anticorpi ad altissima specificità introdotta tramite mutazione: se anche questo processo fallisse non avremmo altre armi contro i patogeni.

## Capitolo 3

### TOLLERANZA IMMUNOLOGICA

(LEZIONE 22-03-18)

È difficile che un qualsiasi tipo di malattia non coinvolga in qualche modo il sistema immunitario: non è facile cioè immaginare una patologia in cui il sistema immunitario non abbia un ruolo. Basti pensare che l'infiammazione, alla base della maggior parte delle patologie, sia un modo per far intervenire in maniera più efficace il sistema immunitario laddove ce ne sia bisogno. Bisogna prestare attenzione a non confondere le patologie proprie del sistema immunitario da quelle che invece ne prevedono solo l'intervento.

CAUSA	MANIFESTAZIONE
eccessiva o inappropriata attivazione	ipersensibilità o infiammazione cronica
perdita di tolleranza	ipersensibilità- malattia autoimmune
difetto di maturazione (delle componenti del sistema immunitario) o mancata attivazione	immunodeficienza primaria o secondaria*  *l'immunodeficienza deve essere tenuta concettualmente separata dai primi due punti della tabella, poiché si tratta di un DEFICIT.
risposta non efficace*  * La risposta si REALIZZA ma non è efficace.	infezione cronica (es: TBC e micobatteri) *  Cancro  *i micobatteri sono patogeni difficili da combattere non perché ci sia un deficit specifico del s.i. ma perché il patogeno è in grado di difendersi in modo efficiente: si protegge con particolari componenti strutturali.

### 3.1 Reazioni di ipersensibilità

Nel caso dell'ipersensibilità si ha un'attivazione ECCESSIVA o SOVRAFISIOLOGICA ed indesiderata dell'immunità. In senso stretto, riguarda solo l'immunità acquisita. Ma questo tipo di reazioni possono avvenire sia verso antigeni propri (si parla allora di malattia autoimmune) o verso

antigeni esogeni, che non sono necessariamente pericolosi. Essendo una patologia dell'immunità acquisita si realizza in tempi medio-lunghi, e prevede un primo contatto in cui generalmente non si ha risposta (SENSIBILIZZAZIONE) e una seconda fase di REALIZZAZIONE. Questo vale sempre, per tutte le reazioni di ipersensibilità. La patologia si sviluppa immediatamente ma solo nel caso in cui il primo contatto si prolunghi nel tempo.

Ad esempio, nel caso della puntura di insetto, la prima volta non si ha coscienza dell'essere allergici alla puntura: viene iniettata una piccola quantità di allergene che permette soltanto la sensibilizzazione, che crea però la memoria. Tale memoria permetterà lo sviluppo di una vera e propria reazione al secondo contatto. Il secondo contatto può essere legato a danneggiamento diretto o indiretto dei tessuti.

-DIRETTO: le cellule citotossiche distruggono le cellule dell'organismo

-INDIRETTO: il sistema immunitario partecipa al mantenimento di uno stato di infiammazione cronica che non porta alla riparazione del danno, che continua ad autoalimentarsi nel tempo.

Le reazioni di ipersensibilità si dividono in quattro categorie:

- IPERSENSIBILITA' di tipo I
- IPERSENSIBILITA' di tipo II
- IPERSENSIBILITA' di tipo III
- IPERSENSIBILITA' di tipo IV

Questa distinzione viene fatta in base ai " protagonisti " dell'ipersensibilità.

### 3.1.1 Ipersensibilità di tipo I

L'**ipersensibilità di tipo I o immediata** è quella legata alle allergie. Anche nelle allergie esiste una fase di sensibilizzazione e c'è bisogno di una fase in cui si forma la memoria. Nelle allergie la risposta è contro agenti esogeni ma innocui, come il polline ad esempio, oppure verso alimenti o punture di insetti, acari, polvere ed altri antigeni che prendono il nome di ALLERGENI, che non sono altro che antigeni per il sistema immunitario. L'allergia prevede un aumento di produzione delle IgE che ha bassa rappresentanza nel siero, per cui è semplice diagnosticare un'allergia o una parassitosi dosando le IgE. Le IgE, infatti, si sono evolute proprio come un mezzo per la difesa contro i parassiti: l'allergia è soltanto un effetto PATOLOGICO dovuto alla disfunzione di tale tipo di risposta.

1) SENSIBILIZZAZIONE: PRIMO CONTATTO CON L'ALLERGENE

2) PRODUZIONE DI IgE DA PARTE DI PLASMACELLE (= SWITCH DI CLASSE VERSO LE IgE)

### 3) LE IgE VENGONO RILASCIATE NEL SIERO E SI DIFFONDONO, LEGANDOSI IN MANIERA STABILE SOPRATTUTTO SUI MASTOCITI.

Il legame delle IgE ai mastociti è permesso dal recettore FcεR, che non è molto diffuso ma è presente in basofili, mastociti ed eosinofili, cellule che hanno tutte un ruolo nella difesa dai parassiti. Sono cellule con granuli contenenti fattori tossici, il cui rilascio è proprio stimolato dal legame delle IgE col recettore (FcεR), che determina un fenomeno di DEGRANULAZIONE. I fattori rilasciati sono sia dannosi per il patogeno sia agenti pro-infiammatori, per questo i mastociti sono implicati anche nelle prime fasi di infiammazione, rilasciando istamine e nelle prime fasi dei fenomeni allergici. Non a caso i farmaci utilizzati contro le allergie sono proprio gli antistaminici, che alleviano i primi sintomi della reazione allergica perché bloccano l'azione dei mastociti.

Il termine *reazione immediata* deriva non tanto dal fatto che esistono fasi di sensibilizzazione, quanto dal fatto che i mastociti sono cellule a lunga vita, e che a seguito della produzione di IgE, le IgE stesse vanno a legarsi in maniera stabile nel tempo ai mastociti. Quindi, anche imbattendosi nell'allergene in modo più o meno continuativo, i mastociti sono già carichi e pronti a rispondere.

Quali sono gli effetti di questa risposta?

La risposta sarà legata alla zona di ingresso dell'allergene:

- aumento della permeabilità dei vasi (tutte le vie d'ingresso)
- costrizione dei bronchi e rilascio di muco, con difficoltà respiratoria (via inalatoria)
- orticaria (via cutanea, via alimentare)

Anche la gravità della risposta può essere legata alla velocità di diffusione sistemica dell'allergene, con la via intravenosa che può produrre più frequentemente shock anafilattico. Fa eccezione la via alimentare in cui è anche frequente l'induzione di shock anafilattico.

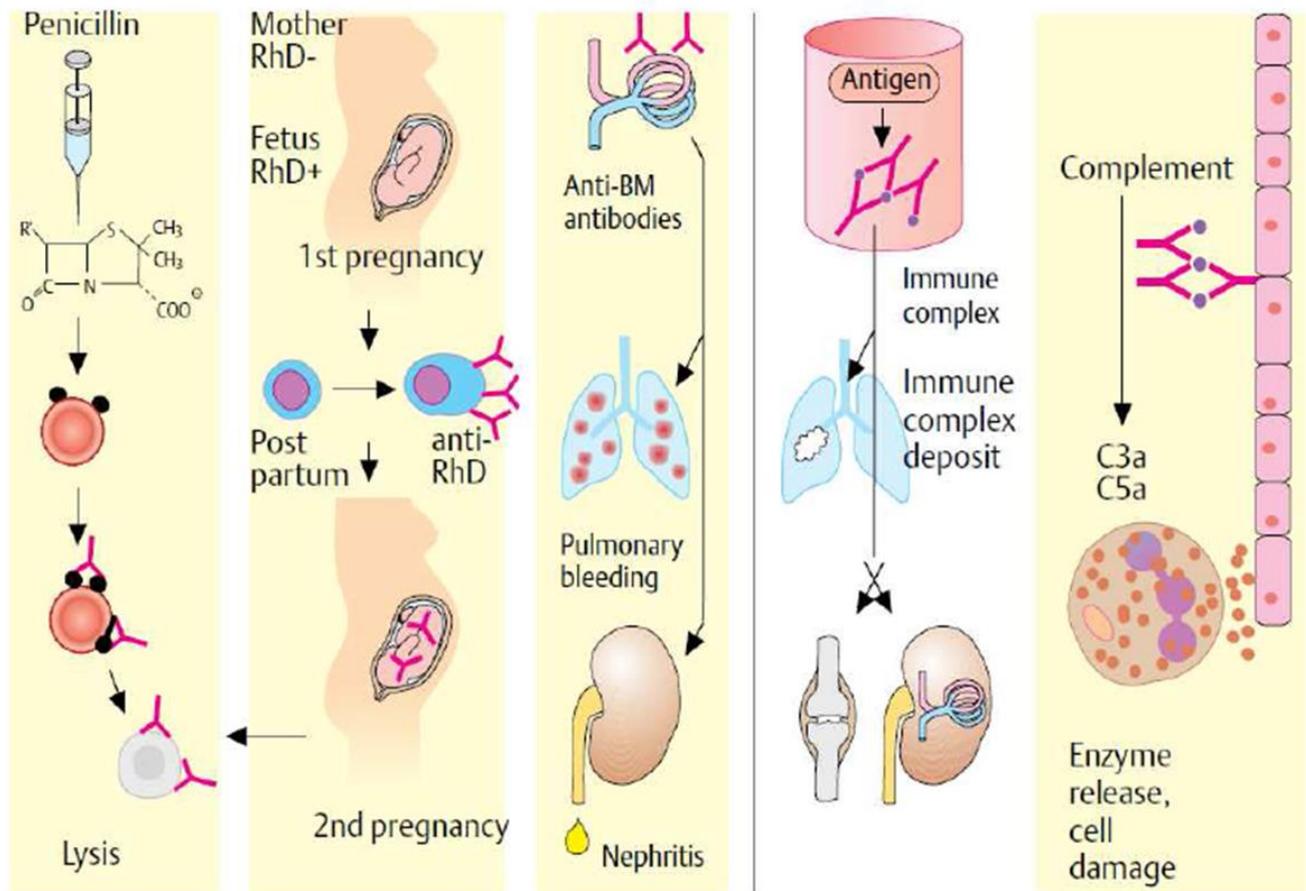
#### 3.1.2 *Ipersensibilità di tipo II*

L'ipersensibilità di tipo II e III si realizzano tramite produzione di IgG o IgM. **L'ipersensibilità di tipo II** può essere di tipo IATROGENO, cioè legata all'utilizzo di un tipo di medicazione o farmaco: ad esempio, la somministrazione di quantità rilevanti di penicillina, soprattutto per via endovenosa, può causare una reazione di lisi sugli eritrociti. La penicillina va a legarsi sulla superficie degli eritrociti come antigene estraneo e quindi vengono prodotti anticorpi che si legano al complesso sugli eritrociti portando alla lisi. Si determina una ANEMIA IMMUNOEMOLITICA:

- ANEMIA, perché si ha una perdita di globuli rossi
- IMMUNO, perché la causa ha a che fare col sistema immunitario
- EMOLITICA, perché si attua attraverso la distruzione dei globuli rossi

Un tipo di anemia immunoemolitica si può avere anche nel caso di eritroblastosi fetale, caratterizzata dal rigetto da parte della madre del feto. La gravidanza è un momento particolarmente traumatico per il sistema immunitario perché la madre porta in grembo antigeni non self. Tra questi antigeni potrebbe esserci il fattore Rh, se la madre non lo possiede: una madre Rh negativo può

portare un feto Rh positivo. Ciò determina il rigetto del feto da parte del sistema immunitario della madre, soprattutto alla seconda gravidanza. Difatti si è visto che nella fase pre-parto e post-parto la madre Rh negativa produce anticorpi contro il fattore Rh. Essendo il parto un momento anche di contatto fra gli antigeni madre-figlio, la seconda gravidanza, in mancanza di intervento, porterà al rigetto e alla morte del feto. L'intervento prevede il mascheramento degli antigeni Rh alla madre nel periodo di sensibilità, pre parto e post parto, con anticorpi che bloccano l'antigene (vedere parte di immunoterapia Cap.10). Gli anticorpi possono essere prodotti anche contro una proteina della matrice extracellulare, ad esempio verso un componente della membrana basale (sindrome di Goodpasture): questo riconoscimento porta ad infiammazione cronica della corticale del rene (glomerulonefrite) e sanguinamento polmonare.



**Typell:** Cytotoxic antibody reactions

**Type III:** Immune complex reaction

### 3.1.3 *Ipersensibilità di tipo III*

**L'ipersensibilità di tipo III** è mediata da IgG ma ha una particolarità rispetto alla II, e cioè che questa reazione avviene soltanto nel sangue, determinando la formazione di immuno-complessi, ossia reti di antigene-anticorpo, che si creano quando la quantità di antigene è molto elevata. Tali complessi si depositano sugli endoteli, e i depositi tramite attivazione del complemento determinano una reazione infiammatoria con conseguente danno. Può avvenire quando carichiamo il sangue con antigeni non self, come nel caso della malattia da siero. Nel caso di immunità passiva,

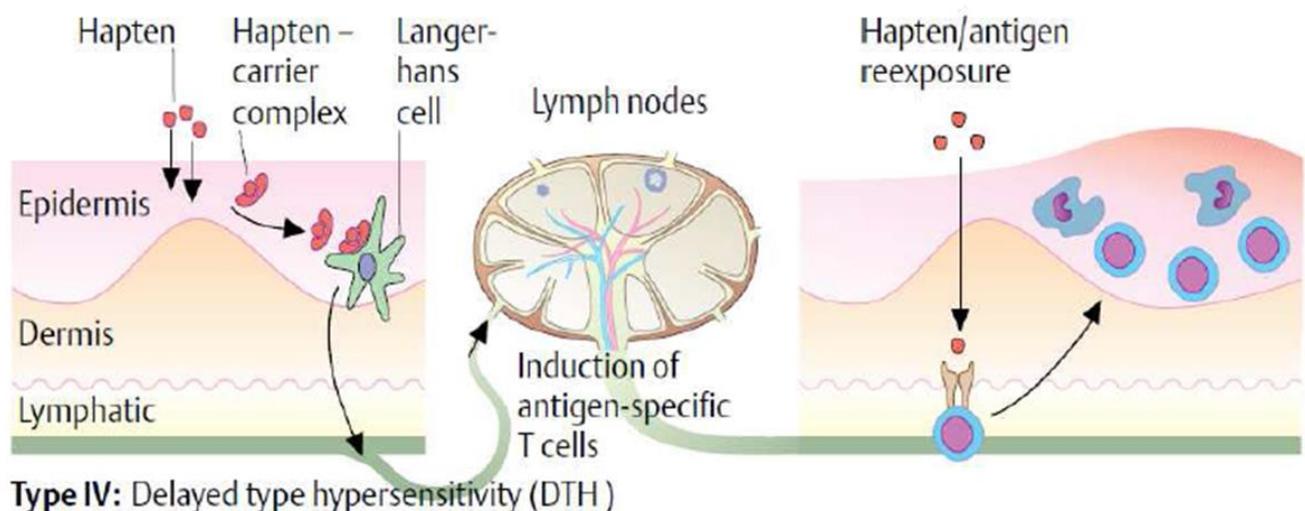
si usa un siero di un'altra specie contenente anticorpi per dare protezione; ma se il siero non è ben purificato le proteine di quella specie entreranno in contatto con le proteine proprie dell'organismo. Il siero bovino possiede circa 5 milligrammi di proteine per ml: la possibilità che si formino immuno-complessi è elevata. Questo discorso vale anche nei casi di malattie autoimmuni, dove ad esempio nel caso di necrosi molto estese vengono rilasciate proteine dal citoplasma in modo massiccio, che pur essendo antigeni self di solito non sono presenti nel sangue, perciò determinano formazione di immuno-complessi.

### 3.1.4 *Ipersensibilità di tipo IV*

L'**ipersensibilità di tipo IV** è una risposta ritardata, e non intervengono anticorpi ma le cellule dell'immunità. La cellula dendritica dal punto in cui riceve il segnale migra verso il linfonodo, attiva i linfociti, che poi tornano nella zona di contatto svolgendo un'azione pro-infiammatoria. Uno degli eventi meglio descritti è la dermatite da contatto, in cui una cellula dendritica reagisce ad elementi di per sé non immunogeni, ossia sostanze molto piccole (APTENI) che stimolano il sistema immunitario quando si legano ad un carrier. La proteina-carrier si modifica dopo legame, la proteina modificata è portata al linfonodo ed è letta come estranea. Dal linfonodo i linfociti Helper o citotossici tornano nella zona in cui è avvenuto il contatto e questo genera una infiammazione, la dermatite. La dermatite da contatto è diversa da quella allergica.

L'aptene è una sostanza in grado di stimolare la risposta immunitaria solo se si lega ad una molecola più grande, tramite aptenizzazione: altrimenti tale sostanza è invisibile al sistema immunitario, non è immunogena. Il legame con una proteina carrier rende l'aptene visibile, formando un complesso che funge da antigene.

Il contatto con un allergene determina una risposta immediata e questa reazione è sfruttata per i test allergici: l'allergene a contatto con la cute dopo pochissimo tempo può dare o meno infiammazione (formazione del pomfo). Ciò non funziona con un aptene, per cui per vedere una reazione si deve attivare una cellula dendritica, che deve effettuare un percorso di avvio verso il linfonodo, attivando linfociti T effettori per poi tornare e creare una zona di infiammazione (occorrono almeno 2-3 giorni). Per questo è più semplice individuare un allergene rispetto all'aptene. Ma la reazione ritardata riguarda anche altri antigeni esogeni, non solo gli apteni.



## 3.2 Tolleranza immunologica

Le reazioni di ipersensibilità sono caratterizzate dall'attivazione eccessiva ed ingiustificata del sistema immunitario contro antigeni innocui, che vengono però percepiti dall'organismo come potenzialmente dannosi. Queste possono portare a conseguenze anche gravi (l'anafilassi), che possono avere esito mortale. Le malattie autoimmuni possono riguardare le reazioni di ipersensibilità di tipo II, III, IV: la caratteristica più pericolosa che riguarda le patologie autoimmuni è che gli antigeni che vengono combattuti sono antigeni self. Prima di analizzare le malattie autoimmuni bisogna ricordare i processi che normalmente in un soggetto sano portano all'acquisizione della tolleranza immunologica: processi che vengono meno nel caso di soggetti affetti, appunto, da malattie autoimmuni.

Il sistema immunitario è una modalità dell'organismo di conoscere l'ambiente esterno, perciò il sistema immunitario deve essere ISTRUITO per poter distinguere in modo efficace il self dal non-self, che deve essere combattuto ed eliminato se potenzialmente dannoso.

La tolleranza immunologica è definita come la mancanza di risposta ad un antigene indotta dalla precedente esposizione a quello stesso antigene. Quando un linfocita incontra un antigene può essere attivato, e quindi dare origine alla risposta immunitaria, o disattivarsi/morire dando luogo alla tolleranza. Gli antigeni in grado di dare origine ad un evento di tolleranza vengono chiamati tollerogeni per distinguerli dagli immunogeni. La tolleranza verso i propri antigeni, o self tolleranza, è perciò una proprietà fondamentale del sistema immunitario.

La tolleranza immunitaria è fondamentale per diverse ragioni:

- Gli individui normali tollerano i loro antigeni perché i linfociti auto-reattivi vengono uccisi, o inattivati.
- L'induzione della tolleranza immunologica può essere sfruttata per un approccio terapeutico nel prevenire risposte immunitarie dannose

L'auto-tolleranza può essere indotta in linfociti self-reattivi immaturi nei siti linfoidi centrali (tolleranza centrale) o in linfociti maturi in siti periferici (tolleranza periferica). La tolleranza centrale assicura che il repertorio di linfociti maturi non riconosca gli antigeni self presenti negli organi linfoidi primari tuttavia non può escludere completamente il riconoscimento di tutti gli antigeni self: questo tipo di tolleranza è mantenuta da meccanismi periferici.

### 3.2.1 Tolleranza centrale

Il riconoscimento del self avviene durante il processo di maturazione dei linfociti nel timo e nel midollo osseo (organi linfoidi primari). La tolleranza centrale si ha perché tutti i linfociti in maturazione passano in una fase in cui incontrano antigeni che portano alla morte cellulare o all'espressione di nuovi recettori o a variazioni nelle funzionalità. I soli antigeni nel timo e nel midollo sono antigeni self in quanto quelli estranei sono trasportati agli organi linfoidi periferici: i linfociti in sviluppo incontrano solo antigeni self ad alte concentrazioni. L'incontro con l'antigene può portare a:

- Morte per apoptosi, detta delezione clonale

- Cambio dei recettori, detto editing recettoriale
- Differenziazione di alcune cellule CD4+ in cellule T regolatorie (Treg) che migrano in periferia per prevenire le reazioni contro il self.

Usciti dal midollo o dal timo, i linfociti sono NAIVE, nativi, ossia i linfociti sono pronti a svolgere la funzione ma non sono attivi, non sono autoimmuni poiché riconoscono solo il non-self, ma sono in quiescenza. A valle di un'attivazione, si parla di linfocita effettore, nel caso dell'intervento delle cellule dendritiche. Negli organi linfoidi centrali (midollo e timo) avviene una selezione negativa delle cellule auto-reattive, su quelle che esprimono BCR o TCR che riconoscono antigeni propri viene attivata una distruzione per apoptosi (SELEZIONE NEGATIVA). I meccanismi di selezione si basano sulla soglia di riconoscimento: se il riconoscimento è forte si ha una selezione negativa, se scarso si ha selezione positiva. Questo processo si basa sulla presenza all'interno degli organi linfoidi primari di antigeni quasi esclusivamente self (nel momento della formazione della tolleranza), presenti in elevatissime concentrazioni, verso cui i linfociti T presentano una forte affinità: perciò una volta usciti dagli organi linfoidi primari o all'interno di quest'ultimi, nel momento in cui incontrano un antigene viene valutata la FORZA di riconoscimento e di affinità con l'antigene stesso, per poter orientare la modalità di selezione. Tutto il processo definisce l'esigenza del sistema immunitario di tollerare il self, ma allo stesso tempo di combattere il non self. Infatti questo non è un meccanismo perfetto, ma di compromesso, per cui esistono comunque dei linfociti naive auto-reattivi o potenzialmente auto-reattivi.

#### Tolleranza centrale dei linfociti T:

Durante la maturazione nel timo molte delle cellule T che riconoscono gli antigeni con troppa avidità vengono eliminate grazie al processo di selezione negativa. I due fattori principali che determinano la selezione negativa dei timociti autoreattivi sono la **concentrazione dell'antigene** nel timo e l'**affinità dei TCR** del timocita per tali antigeni. Gli antigeni self vengono processati e presentati sulle molecole MHC dalle APC del timo; questi antigeni includono molte proteine circolanti o associate alle cellule. Alcune proteine inizialmente credute espresse solo nei tessuti periferici sono invece presenti nelle cellule epiteliali timiche sotto controllo del **gene regolatore autoimmune (AIRE)**. La proteina AIRE funziona come fattore di trascrizione per promuovere l'espressione di antigeni selezionati nel timo. Il processo di selezione interessa sia le cellule MHC I ristrette che quelle MHC II ristrette ed è dunque importante sia per le popolazioni CD4+ che CD8+.

Alcuni dei linfociti T CD4+ che riconoscono gli antigeni self nel timo non vengono eliminati ma differenziano invece in **cellule regolatrici** che lasciano il timo e inibiscono risposte ai tessuti self in periferia.

#### Tolleranza centrale dei linfociti B:

I linfociti B maturi che riconoscono il self in periferia in assenza di helper possono essere resi inoffensivi o portati a morte per apoptosi. L'incontro con l'antigene self riduce la sopravvivenza del linfocita e ne promuove la morte apoptotica intrinseca. I linfociti che incontrano il self in periferia mostrano minor capacità di migrare nei follicoli: probabilmente il riconoscimento cronico dell'antigene porta alla **sottoespressione del recettore CXCR5** per chemochine che normalmente

porta i linfociti B nei follicoli. Le cellule escluse dai follicoli non ricevono i segnali sufficienti per sopravvivere e muoiono.

Si sospetta che molte malattie causate da anticorpi contro il self siano legate a fallimenti della tolleranza dei linfociti B. Individui normali non producono autoanticorpi patogenici ad alta affinità contro antigeni self, e questo potrebbe essere legato alla delezione o alla tolleranza degli Thelper anche in presenza di linfociti B funzionanti. In questi casi difetti nel mantenimento della tolleranza T possono risultare nella produzione di autoanticorpi.

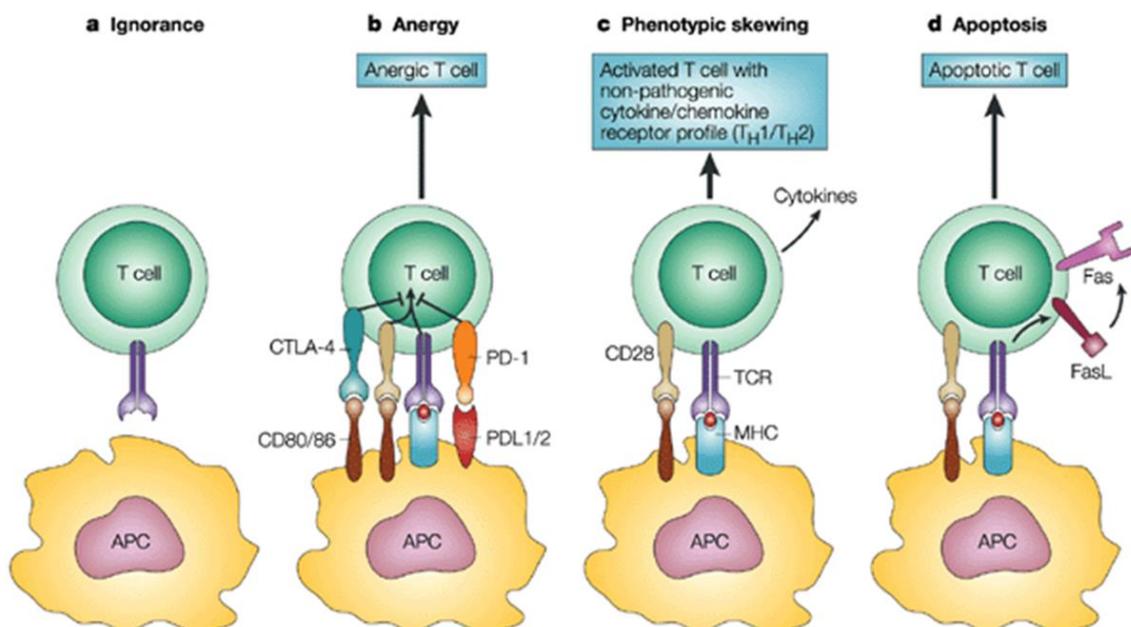
### 3.2.2 Tolleranza periferica

In associazione ad una tolleranza centrale, perciò, vi è il bisogno di una tolleranza periferica. La tolleranza periferica si ha quando il linfocita maturo che riconosce il self diventa incapace di riconoscere tale antigene, o quando viene indotto all'apoptosi o ne viene ridotta l'emivita. La tolleranza periferica serve a garantire la non risposta ad antigeni non presenti negli organi linfoidi primari.

La tolleranza periferica utilizza dei meccanismi propri dei linfociti per acquisire la capacità di discernere il self dal non-self.

- Ignoranza
- Anergia
- Immunodeviiazione fenotipica
- Delezione

#### Tolleranza periferica dei linfociti T:



- **Il meccanismo più semplice adottato dai linfociti T è l'ignoranza.** il sistema immunitario reagisce solo a ciò che riconosce, se non c'è abbastanza antigene o l'antigene è mascherato, difficilmente è in grado di attivare il sistema immunitario. Quest'ultimo reagisce contro antigeni stabili nel tempo e nella struttura.
- **Anergia indotta da riconoscimento di antigeni self.** L'esposizione di cellule CD4+ ad un antigene **senza co-stimolazione** può rendere tali cellule incapaci di rispondere. La piena attivazione delle cellule T richiede il segnale dal TCR e il riconoscimento dei co-stimolatori, principalmente B7-1 e B7-2, da parte di CD28. Una segnalazione prolungata del solo TCR può portare ad anergia: questa situazione è plausibile per gli antigeni self che non generano immunità innata o forte co-stimolazione.

L'anergia è il risultato di **alterazioni biochimiche o genetiche** che riducono la capacità del linfocita di rispondere. Sono numerose le alterazioni biochimiche ritenute necessarie per mantenere questo stato di mancata risposta:

- Le cellule anergiche mostrano un **blocco nella trasduzione del segnale del TCR**. A volte sembra legato a una sottoespressione del TCR, a volte al reclutamento di molecole inibitorie quali le fosfatasi.
- Gli antigeni self potrebbero attivare **ubiquitina-ligasi** cellulari che potrebbero ubiquitinare le proteine TCR associate portandole a degradazione: il risultato è ancora una volta una riduzione del segnale del TCR.
- Quando il linfocita riconosce l'antigene self potrebbe attivare i **recettori inibitori della famiglia di CD28**, le cui funzioni sono di terminare la risposta. I due recettori il cui ruolo nella tolleranza self è meglio descritto sono **CTLA-4** e **PD-1 (CHECKPOINT IMMUNOLOGICI)**. In particolare CTLA-4 compete con CD28 per i co-stimolanti B7 escludendolo dalla sinapsi immunitaria, inoltre porta diversi segnali inibitori che bloccano quelli che attivano il TCR. PD-1 riconosce invece due ligandi espressi sulle APC e su altre cellule e questo riconoscimento porta all'inattivazione del linfocita T.

Le cellule dendritiche residenti nei tessuti linfoidi sono ritenute tolleranti e alla base del mantenimento dei meccanismi di tolleranza periferica. Le cellule dendritiche attivate, soprattutto da un ambiente pro-infiammatorio sono dunque le principali APC per scatenare la risposta dei linfociti T, mentre quelle a riposo potrebbero avere ruolo tollerogenico. La cellula DENDRITICA in periferia si trova in uno stato immaturo, in questo stato anche se dovesse riconoscere un linfocita auto-reattivo farebbe partire meccanismi di anergia e di apoptosi. Le cose cambiano drasticamente quando ci sono chiari stimoli di pericolo: ad esempio l'ingresso di batteri (presenza di LPS o di PAMP legati a patogeni), o il rilascio di segnali di stress da parte delle cellule (Heat shock proteins) che indicano alla cellula dendritica che deve maturare e poi avviare il meccanismo di attivazione dei linfociti T. I Treg sono gli unici linfociti T in grado di riconoscere gli antigeni self. I Treg emergono dal timo come già auto-reattivi, ma hanno funzione di immunosoppressione poiché rilasciano citochine immunosoppressive come IL-10 e TGF-beta; la presenza di cellule dendritiche

immature e la presenza di Treg fanno sì che anche la possibile comparsa di linfociti T Helper reattivi non venga portata a compimento.

- **Immunodeviiazione fenotipica.** L'immunodeviiazione è legata al rapporto Th1 e Th2. Th1 è una sotto-popolazione attivata a valle di una infezione di patogeni virali o batterici, mentre i Th2 agiscono contro i parassiti. Proprio come possibilità di danneggiare i tessuti, Th1 è più potente di Th2, e se c'è un ambiente favorevole alla reazione Th2, questa non è associata a una reazione autoimmune, mentre nel caso dei Th1 vale il contrario. L'ambiente di citochine che favoriscono Th1 piuttosto che Th2 favorisce una reazione autoimmune.
- **Delezione dei linfociti T per apoptosi** I linfociti T che riconoscono il self senza infiammazione o che sono ripetutamente stimolati muoiono per apoptosi: questo tipo di morte è stata chiamata **morte cellulare attivazione-indotta**. La morte apoptotica può avvenire secondo due vie biochimiche: **via recettoriale** e **via mitocondriale**.
  - I linfociti T che riconoscono il self senza co-stimolazione o senza una risposta innata ad accompagnarli possono attivare la **proteina pro-apoptotica Bim**, imboccando così la **via mitocondriale** per l'apoptosi. Nelle normali risposte linfocitarie i segnali del TCR stimolano l'espressione di **proteine anti apoptotiche della famiglia di Bcl-2** che promuovono la sopravvivenza e la proliferazione della cellula. **Bim** può essere attivata dal riconoscimento del self in assenza di co-stimolazione o fattori di crescita e attiva a sua volta proteine effettrici che fanno scattare la morte programmata.
  - Il ripetuto stimolo ai linfociti determina l'espressione dei recettori di morte e dei loro ligandi, e l'attivazione di tali recettori porta a morte apoptotica. Nelle cellule CD4+ il recettore di morte fondamentale è **Fas**, il cui ligando è **FasL**. A seguito di molte attivazioni FasL viene espresso sulla superficie cellulare e si va a legare a Fas sulla superficie della cellula stessa o di quelle adiacenti. L'interazione Fas-FasL attiva la cascata delle caspasi che porta a morte la cellula. Mutazioni in Fas o FasL portano a malattie autoimmuni simili al LES (lupus eritematoso sistemico).

#### Tolleranza periferica dei linfociti B:

I linfociti B maturi che riconoscono il self in periferia in assenza di helper possono essere resi inoffensivi o portati a morte per apoptosi. L'incontro con l'antigene self riduce la sopravvivenza del linfocita e ne promuove la morte tramite la via mitocondriale. I linfociti che incontrano il self in periferia mostrano minor capacità di migrare nei follicoli: probabilmente il riconoscimento cronico dell'antigene porta alla **sotto-espressione del recettore CXCR5** per chemochine che normalmente porta i linfociti B nei follicoli. Le cellule escluse dai follicoli non ricevono i segnali sufficienti per sopravvivere e muoiono.

Si sospetta che molte malattie causate da anticorpi contro il self siano legate a fallimenti della tolleranza dei linfociti T. Individui normali non producono autoanticorpi patogenetici ad alta affinità contro antigeni self, e questo potrebbe essere legato alla delezione o alla tolleranza dei linfociti T helper anche in presenza di linfociti B autoreattivi. In questi casi difetti nel mantenimento della tolleranza T possono risultare nella produzione di autoanticorpi.

### 3.3 Le malattie autoimmuni

Dopo aver elencato le modalità con cui il sistema immunitario costruisce la tolleranza verso il self una domanda sorge spontanea: ma allora perché si sviluppano le malattie autoimmuni? Non sono note le cause precise, ma nel sistema immunitario si verifica o una perdita della tolleranza acquisita contro il self, oppure un malfunzionamento dei processi che portano allo sviluppo di questa protezione. Tale lacuna culturale limita fortemente gli interventi terapeutici, perciò possono essere effettuate solo delle ipotesi sulla patogenesi. Ci si basa su uno schema di ipotesi a 3 livelli:

- 1) **PREDISPOSIZIONE GENETICA EREDITARIA.** Le malattie autoimmuni hanno una familiarità, anche se le malattie che si manifestano non sono sempre le stesse. Vale anche per le allergie. **NON** si conosce però un gene responsabile, tranne rari casi. I **FENOMENI DI PREDISPOSIZIONE** possono avvenire anche a livello temporaneo per lo sviluppo della malattia, che poi scompaiono.
- 2) **FASE DI INIZIAZIONE.** Può essere un evento scatenante che determina la malattia autoimmune: si è visto che più frequentemente si sviluppa una malattia autoimmune a seguito di questi eventi.
  - o Infiammazioni ripetute.
  - o Stato di infiammazione che non si risolve velocemente.
  - o Esposizione ad altre concentrazioni di antigeni self nascosti che vengono rilasciati, per i quali ci dovrebbe essere ignoranza, ma a lungo andare scatenano una reazione autoimmune.
- 3) **FASE DI PROPAGAZIONE.** La propagazione è quando a seguito della stimolazione autoreattiva il continuo danno tissutale rinforza ulteriormente l'autoimmunità tramite il rilascio di nuovi antigeni nascosti.

#### 3.3.1 Predisposizione genetica

Molte delle malattie autoimmuni si sviluppano in soggetti che hanno un particolare sierotipo MHC di classe II.

Malattia	Sierotipo	Rischio Relativo (NEI SOGGETTI CHE PORTANO QUESTI SIEROTIPI)
Morbo di Graves	DR3	4
Diabete I	DR 3/4	<b>20-25</b> (il rischio è molto alto, l'associazione col sierotipo è molto forte)
Sclerosi multipla	DR 2/3	5-10
Artrite reumatoide	DR4	4

SLE (LUPUS ERIMATOSO SISTEMICO)	DR3	6
---------------------------------	-----	---

Molte malattie autoimmuni seppur diverse sono accomunate dallo stesso sierotipo. Esiste quindi una ASSOCIAZIONE DI SUSCETTIBILITA' della perdita di tolleranza con alcuni sierotipi.

Esiste anche un'associazione col recettore CTLA-4, che fa riferimento alla tolleranza periferica, qualsiasi suo polimorfismo o mutazione determina un malfunzionamento del meccanismo di tolleranza periferica. Ci sono poi altre evidenze che presuppongono un background genetico di predisposizione: risposta temporanea autoimmune alla somministrazione di farmaci; maggiore incidenza nelle donne; predisposizioni aumentata e temporanee legata a fluttuazioni ormonali. In particolare gli ormoni sessuali giocano un ruolo importanti nelle malattie autoimmuni, e questo potrebbe essere alla base della più alta frequenza nelle donne, come nel caso della SLE, dove il rapporto tra le donne e gli uomini colpiti è 9:1.

Per quanto riguarda i fattori monogenetici, sono state descritte mutazioni nell'uomo e in animali da sperimentazione associate a varie sindromi autoimmuni che sono indicative perchè l'insorgenza delle malattie autoimmuni è chiaramente legata a malfunzionamenti dei meccanismi di tolleranza. Ad esempio, nella sindrome autoimmune poliendocrina di tipo 1, si trova una mutazione del gene AIRE, espresso nel timo e fondamentale per l'acquisizione della tolleranza centrale. La mutazione è a monte dei meccanismi di tolleranza e dà una sindrome sistemica che colpisce vari organi. Oppure, la mutazione del gene FOXP3, necessario per la maturazione dei linfociti Treg, comporta la mancata tolleranza periferica, ed è alla base dell'insorgenza della sindrome XLAAD.

Altri difetti genetici riguardano la sindrome proliferativa autoimmune, con deficit del recettore Fas o un deficit del complemento a livello del gene C1q. Sono processi legati all'impossibilità di eliminare i linfociti reattivi in periferia o dei corpi apoptotici.

FATTORI GENETICI	MUTAZIONI
tolleranza timica incompleta	gene AIRE
difetto di differenziamento Treg	gene FoxP3
deficit di apoptosi	gene FAS
deficit del complemento	gene C1q

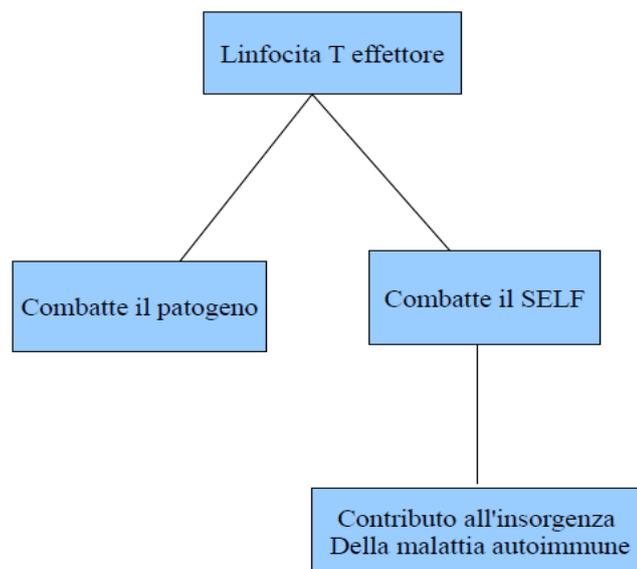
**MALATTIA AUTOIMMUNE = PERDITA DI TOLLERANZA A LIVELLO CENTRALE O PERIFERICO**

### 3.3.2 Fase di iniziazione

Esistono 3 possibilità:

- **INFIAMMAZIONE CRONICA:** dovuta ad agenti fisici (raggi solari) o chimici che alterano antigeni self.
- **INFEZIONE** e distruzione di barriere di tessuti privilegiati
  - o **NECROSI ESTESA**
  - o **ATTIVAZIONE ASPECIFICA DEI LINFOCITI (SUPERANTIGENI)**
  - o **ATTIVAZIONE DI LINFOCITI POTENZIALMENTE AUTOREATTIVI** nel sito di infiammazione (**EFFETTO BYSTANDER**)
- **MIMETISMO MOLECOLARE:** Vengono prodotti anticorpi che riconoscono contemporaneamente self e non self, per una sorta di somiglianza strutturale tra gli antigeni self e non self. Questo è stato sperimentalmente dimostrato in alcuni modelli animali in cui ad esempio, nella febbre reumatica viene prodotto un anticorpo contro la miosina, e si è vista una concordanza tra un epitopo della miosina e la proteina di parete dello Streptococco. A livello clinico già si sapeva che chi sviluppa l'artrite reumatoide lo faceva a seguito dell'infezione da Streptococco beta-emolitico (determinanti tra l'altro infezioni alle vie aeree). In realtà il sistema immunitario cerca di combattere lo Streptococco, ma gli anticorpi riconoscono anche un epitopo della miosina. Nel caso della sclerosi multipla, si è trovato che il bersaglio self proteina basica della mielina ha una somiglianza strutturale con una proteina del virus Epstein-Barr. Ciò non vuol dire che tutti i soggetti infettati dal virus sviluppino Sclerosi, ma rimane comunque una spiegazione di un possibile cofattore dell'autoimmunità. La cosa interessante è che in molti casi esiste a livello clinico una concordanza tra un certo tipo di infezione e la malattia autoimmune.

Patogeno-----> riconosciuto dalla cellula dendritica-----> attivazione del linfocita T nativo in effettore



### 3.3.3 Fase di propagazione e interventi terapeutici

Le malattie autoimmuni portano alla distruzione del tessuto bersaglio di tipo necrotico e quindi con dispersione di nuovi epitopi che alimentano localmente la malattia autoimmune (epitope spreading). La continua distruzione del tessuto si attua in un contesto di infiammazione cronica.

Non esistono cure per le malattie autoimmuni. Alcune strategie possibili sono atte a limitarne i segni clinici:

- ANTINFIAMMATORI, che dovrebbero agire sulla fase di propagazione, contenendo gli effetti dannosi dell'infiammazione cronica
- IMMUNOSOPPRESSIONE, efficace per malattie autoimmuni in quanto va ad agire sul funzionamento del sistema immunitario nella sua fase effettrice. Naturalmente l'immunosoppressione ha lo svantaggio di andare a indebolire le normali difese dell'organismo (aumento di suscettibilità alle infezioni e tumori). In questa categoria rientrano anche gli anticorpi che bloccano le citochine pro-infiammatorie (anti-TNF)
- INDUZIONE DELLA TOLLERANZA: non è un aspetto semplice da trattare, perché la tolleranza non si può indurre nell'adulto facilmente, si potrebbe applicare forse nei primi anni di sviluppo del soggetto. Siccome non esistono diagnosi precoci, è difficile intervenire precocemente, però nei modelli animali alcuni esperimenti si sono dimostrati promettenti. Si potrebbe indurre la tolleranza con somministrazioni di antigeni self durature e crescenti nel tempo (soprattutto nei primi mesi di vita); è stato fatto per la proteina basica della mielina o il collagene di tipo II. In parte può funzionare, perché il sistema immunitario in via di sviluppo riesce a rimodulare la propria tolleranza e non sviluppare l'autoimmunità. Ma per procedere in tal senso, bisogna avere la certezza che quel soggetto sviluppi la malattia autoimmune. Ed in parte, questo intervento risulta possibile anche nel caso delle allergie.

Nei casi specifici i deficit fisiologici generati dalla malattia autoimmune possono essere fronteggiati ripristinando i fattori mancanti. Ad esempio, nel caso del diabete I dove vengono distruggono le cellule che producono insulina si fanno somministrazioni di insulina, o nell'anemia perniciosa si somministra vitamina B12.