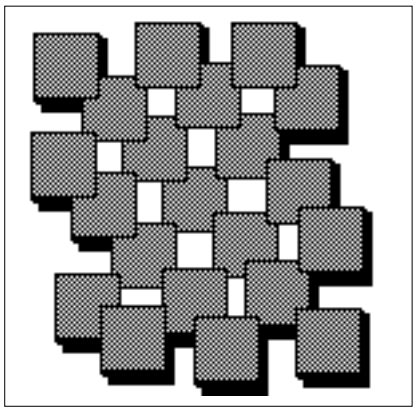
Caleidoscopio



Licinio Contu
Marcella Arras

Molecole di membrana e funzione immunologica

Parte prima: Organizzazione del sistema immunitario

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

73

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1992

Editoriale

Nel presentare il precedente volume del Prof. Licinio Contu e della dottoressa Marcella Arras sulle *Popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie* dissi che si trattava di un volume unico. Tale si è dimostrato tanto che è andato rapidamente esaurito e si è subito posto il problema di una ristampa.

Ma la preparazione di questa ristampa è stata una continua rincorsa all'aggiornamento per la rapida evoluzione delle conoscenze in questo settore. Queste hanno convinto gli Autori a rivedere in buona parte i contenuti del primo volume ed a ripensare l'opera che è praticamente un nuovo lavoro che verrà pubblicato in tre volumi in questi mesi.

Il Professor Licinio Contu è uno degli allievi prediletti e dei principali collaboratori del Professor Jean Dausset (premio Nobel per la Medicina 1980) fin dal 1962.

Con lui ha partecipato agli studi che hanno portato alla descrizione del sistema HLA, alla definizione del suo ruolo biologico ed alle sue principali applicazioni pratiche: nei trapianti allogenici, come sistema principale d'istocompatibilità; nella medicina predittiva (e in prospettiva nella medicina preventiva), come marcatore genetico di predisposizione ereditaria in numerose malattie ad etiopatogenesi sconosciuta e di notevole impatto medico e sociale; nella medicina forense, per l'accertamento di paternità, e nelle indagini di genetica di popolazione, grazie al suo estremo polimorfismo. Oggi collabora ufficialmente con la sua equipe al progetto internazionale di mappaggio del genoma umano coordinato dal Prof. Dausset.

Avviato alla ricerca clinica e sperimentale dal prof. Ugo Carcassi fin dal 1955, nell'Istituto di Clinica Medica dell'Università di Siena, il prof. Contu ha potuto usufruire, negli anni della sua maturazione scientifica, dell'insegnamento di grandi genetisti come Luigi Luca Cavalli Sforza, dal quale ha appreso la metodologia biometrica e i fondamenti della genetica di popolazione, e Ruggero Ceppellini, al quale deve la passione per lo studio dell'immunologia e della genetica medica. Il prof. Contu ha completato la sua formazione di ematologo e di immunogenetista all'Università di Parigi nei lunghi periodi trascorsi, tra il 1962 e il 1983, nel prestigioso Hôpital Saint-Louis, alla scuola di Jean Bernard, uno dei più grandi ematologi del secolo, e di Jean Dausset, al quale l'umanità deve la scoperta fondamentale del sistema HLA.

Autore di oltre 350 pubblicazioni scientifiche, il prof. Contu ha fornito numerosi contributi originali, tra i quali: - gli studi sul meccanismo genetico e biochimico del favismo; - la dimostrazione di una glutation-perossidasi nei globuli rossi umani, del suo ruolo protettivo nei confronti delgli agenti ossido-riducenti, della sua inattività nei globuli rossi fabici, e del carattere critico di tale inattività nel meccanismo della lisi ossidativa delle emazie G-6-P-D carenti; - le ricerche sulla genesi delle citopenie autoimmuni da farmaci, con la formulazione della teoria della "lisi passiva in vivo" o del "passante innocente"; - gli studi sul polimorfismo genetico delle β-lipoproteine LDL, con la scoperta degli antigeni Ag (y) e Ag (m) e il contributo alla descrizione del sistema Ag e alla conoscenza della genetica formale e di popolazione di tale sistema;

- la descrizione del locus HLA-DR, con la definizione dei principali antigeni e la dimostrazione del ruolo preminente di essi, come antigeni di istocompatibilità, nei trapianti. Suoi sono, tra gli altri, i tentativi di approccio alla terapia dell'AIDS con il trapianto di midollo osseo da donatore immunizzato nei confronti dell'HIV.

Professore Ordinario di Genetica Medica dell'Università di Cagliari, presso l'Istituto di Clinica Medica, è Direttore del Centro di Tipizzazione Tissutale, del Centro di Riferimento Regionale per i Trapianti d'Organo, e del Centro per i Trapianti di Midollo Osseo della stessa Università.

Membro della Commissione Nazionale AIDS fin dalla sua istituzione, dirige il Servizio di studio diagnosi e cura delle infezioni da HIV presso l'Istituto di Clinica Medica della stessa Università.

Il Professor Contu è stato diversi anni Maestro di Ricerca dell'INSERM di Parigi e Professore Associato di Ematologia dell'Università di Parigi.

La dottoressa Marcella Arras, allieva e collaboratrice del Professor Contu, è specialista in Ematologia, lavora presso la Cattedra di Genetica Medica dell'Università di Cagliari, dove è responsabile del laboratorio di Citofluorimetria a flusso, e svolge attività clinica prevalentemente nel campo del trapianto di midollo osseo e dell'onco-ematologia in qualità di assistente del Centro per i trapianti di midollo osseo. La dottoressa si occupa da diversi anni della problematica delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie applicando i più moderni approcci metodologici, con particolare riferimento all'assetto fenotipico linfocitario dei neonati sani, dei pazienti affetti da β-talassemia pre- e post trapianto di midollo osseo, dei pazienti con infezioni da HIV, e con diversi altri quadri morbosi come sarcoma di Kaposi classico, Lichen ruber planus, carcinomi cutanei multipli, leucemie e linfomi.

Sergio Rassu

Introduzione

La superficie dei linfociti e delle altre cellule del sistema immunitario è ricoperta da una moltitudine di molecole proteiche che si muovono con relativa libertà nel magma semifluido del doppio strato lipidico della membrana. Si tratta generalmente di glicoproteine integrali di tipo 1 strutturate in monomeri o in dimeri e composte da una porzione esterna NH_2-terminale, da una porzione transmembrana e da una porzione intracitoplasmatica COOH-terminale. Da esse dipende la vita della cellula, la sua idoneità ad interagire con l'ambiente esterno ed a cooperare con altre cellule, la sua capacità proliferativa, la sua evoluzione ontogenetica, la sua maturazione funzionale e le attività che essa può espletare nell'ambito della difesa immunitaria. Da queste molecole e dalla loro attitudine a ricevere differenti segnali esterni provenienti da strutture self e non-self, incontrate casualmente nell'organismo, e a trasmetterli all'interno della cellula, inducendovi reazioni e mutamenti esattamente programmati, alcuni dei quali irreversibili, sia a livello dei geni che del fenotipo di membrana, dipende, in ultima analisi, la funzione immunologica nelle sue componenti afferente ed efferente e nelle fasi di ricircolazione e sorveglianza, di homing e di attivazione. La chiave di lettura unitaria che meglio si adatta a interpretare tutto questo è sicuramente quella fornita da Jacques Monod con "il caso e la necessità". Casuale è l'evento per il quale una cellula che si trova in una certa tappa maturativa o in un certo stato funzionale e che possiede sulla membrana diversi recettori, ciascuno specifico per un particolare ligando, incontra uno o l'altro di questi ligandi. Necessaria ed obbligata è la successione di eventi che consegue a tale incontro casuale, e che spinge la cellula verso una tappa maturativa più avanzata o verso uno stato funzionale differente. Da questo gioco di casualità e di necessità dipende il fatto che una cellula staminale diventi c. eritroide, piastrinica, mieloide, monocitaria o linfoide, che una cellula linfoide evolva in senso T o B, che una cellula linfoide T acquisisca recettori TCRαβ o γδ, che una cellula T con TCRαβ diventi linfocita T helper-inducer ($CD4^+$) o linfocita T citotossico-soppressore ($CD8^+$), che un linfocita T vergine diventi T memoria, o che il repertorio finale T comprenda solamente cloni T con TCRαβ specifici per molecole HLA self e per peptidi non-self, e che infine i linfociti T sappiano contrarre interazioni adesive transitorie con altre cellule immunitarie (come linfociti B e cellule macrofagiche) e non immunitarie (come cellule endoteliali, cellule nervose e fibroblasti) e con strutture della matrice extracellulare, potendo così, a seconda delle circostanze, ricircolare e sorvegliare tutto l'organismo, oppure dislocarsi negli organi e tessuti linfoidi periferici, richiamati da antigeni estranei, e dar luogo a specifiche, efficaci e controllate reazioni di difesa. In modo analogo le altre cellule immunitarie acquisiscono maturità funzionale. Così i linfociti B divengono, grazie ai recettori Ig, agli antigeni HLA di classe II, e ad altri markers presenti sulla membrana, cellule APC, o

cellule B memoria o plasmacellule che, a seconda dei recettori IL-R, produrranno immunoglobuline di una delle differenti classi o sottoclassi.

Tutto questo evidenzia il ruolo essenziale delle molecole di membrana: 1) nella genesi delle varie cellule immunitarie e in particolare dei diversi sets, subsets e sub-subsets linfocitari; 2) nell'organizzazione funzionale delle strutture linfoidi e in particolare dei centri germinativi; e 3) in tutte le fasi della funzione immunologica. Giustifica inoltre l'interesse sempre maggiore riposto dai ricercatori nello studio di tali molecole che ha portato, negli ultimi anni, ad accrescerne notevolmente il numero attualmente conosciuto e ben definito nelle caratteristiche molecolari, funzionali e genetiche, non solo come molecole CD e come molecole di adesione, ma anche come recettori di molecole essenziali alla funzione immunologica (Ig, Interleuchine, Interferoni, Fattori del Complemento, etc.), e come recettori di riconoscimento di antigeni. Interesse che ha portato inoltre a chiarire i meccanismi di processazione degli antigeni e di trasporto endocellulare dei peptidi endogeni ed esogeni, a riconoscere le principali molecole coinvolte, come le HSP, TAP, LMP, e a meglio definire il ruolo delle molecole HLA e TCRαβ rispettivamente nella presentazione e nel riconoscimento dei peptidi antigenici, e nella interazione con i superantigeni.

La funzione immunologica è dunque largamente dipendente dalle molecole di membrana. Questo abbiamo ritenuto utile adottare come filo conduttore del nostro lavoro, in una moderna visione della immunologia, e abbiamo voluto sintetizzare nel titolo.

Il Sistema Immunitario

1. Generalità

La sopravvivenza degli individui è in gran parte garantita dal possesso di un efficiente sistema immunitario capace innanzitutto di discriminare con elevata specificità le strutture autologhe (self) da qualunque struttura proteica estranea (nociva o no) e successivamente di mettere in atto una serie di operazioni in grado di eliminare la struttura proteica estranea senza danneggiare il self. Il sistema immunitario si è sviluppato nel corso dell'evoluzione biologica come strumento indispensabile per la salvaguardia di organismi sempre più complessi, e delle corrispondenti specie, nei confronti delle aggressioni provenienti da un ambiente esterno continuamente mutevole, affinando e adeguando progressivamente le due funzioni fondamentali sopra ricordate, e cioè: 1) riconoscimento del self e dell'estraneo; 2) reattività specifica nei confronti dell'estraneo.

Nella sua versione più evoluta, cioè quella che si è realizzata nei mammiferi ed in particolare nell'uomo, queste due funzioni sono garantite essenzialmente dai linfociti, grazie a specifiche strutture recettoriali di membrana, che proprio sulla base di una precisa discriminazione del self e del non-self, rendono possibile la risposta difensiva, sia cellulare che umorale, nei confronti degli agenti "aggressivi" esterni. Tale risposta è tuttavia il risultato di un'attività finemente coordinata e integrata di un insieme di cellule diverse (linfociti T, linfociti B, cellule killer naturali, monociti e macrofagi) ciascuna con compiti diversi, ma tutti essenziali. Il riconoscimento del bersaglio della reazione immunologica da parte di queste cellule, avviene attraverso meccanismi diversi per ciascun tipo di cellula.

1) La cellula possiede recettori di membrana che interagiscono con particolari strutture estranee di tipo polisaccaridico (per es. batteri) o con siti presenti in alcune molecole proteiche autologhe come immunoglobuline, fattori del complemento, proteina C-reattiva. Il riconoscimento del bersaglio non-self è aspecifico e può essere <u>diretto</u> oppure <u>mediato</u> dalla preliminare adesione su di esso delle sieroproteine autologhe sopra ricordate. E' il tipo di riconoscimento realizzato da monociti, macrofagi, linfociti NK e da piccoli subsets di linfociti T citotossici. Generalmente il bersaglio non-self è ricoperto da specifici anticorpi sui quali queste cellule riconoscono un sito Fc grazie a specifici recettori Fc-R.

2) La cellula possiede recettori di membrana che interagiscono in modo altamente specifico con un determinato sito epitopico non- self. Ciascuna cellula (o clone cellulare) di questo tipo possiede numerosi recettori tutti con identica specificità, ma diversa da quella delle altre cellule (o cloni), in modo tale che l'insieme di queste cellule dispone di un repertorio recettoriale estremamente vasto capace di riconoscere praticamente qualunque proteina estranea. E' questo il tipo di riconoscimento realizzato dai linfociti B, grazie alla presenza sulla loro membrana delle immunoglobuline.

3) La cellula possiede recettori di superficie che riconoscono in modo strettamente

specifico strutture non-self (peptidi) contestualmente a strutture self (HLA) che le espongono sulla membrana della cellula bersaglio. Anche in questo caso ciascuna cellula (o clone) di questo tipo riconosce specificamente una differente struttura non-self costituendo così un vasto repertorio, che analogamente a quello dei linfociti B, è potenzialmente in grado di riconoscere qualunque struttura proteica estranea. Viceversa il repertorio di riconoscimento nei confronti delle molecole HLA (che presentano le strutture estranee) è rigorosamente limitato alle molecole autologhe. Ciò costituisce il fenomeno noto come restrizione genetica HLA. Questo tipo di riconoscimento, altamente specifico, è una prerogativa dei linfociti T realizzata dai recettori TCR, i quali come verrà detto meglio più avanti si ritiene che siano dotati di due superfici di riconoscimento una per il non-self peptidico ed una per la molecola HLA autologa.

Le modalità della fase effettrice della risposta immunologica ricalcano in parte il meccanismo stesso del riconoscimento, ma dipendono anche dalle caratteristiche delle cellule effettrici e delle cellule che presentano l'antigene. Così i linfociti T citotossici si legano al bersaglio per mezzo dello stesso recettore utilizzato nella fase di riconoscimento, e realizzano la sua distruzione attraverso la liberazione di proteine citolesive chiamate poliperforine. Lo stesso meccanismo di distruzione della cellula bersaglio è messo in opera dai linfociti killer naturali le cui strutture recettoriali riconoscono di solito le molecole estranee indirettamente, senza specificità e senza restrizione HLA, grazie all'intermediazione di immunoglobuline o di altre glicoproteine. Si ritiene tuttavia che queste cellule dispongono anche di recettori NK-R specifici per particolari epitopi non-self e che possono riconoscere in restrizione HLA-Cw.

Le cellule di tipo monocitario-macrofagico, i cui sistemi di riconoscimento del bersaglio sono largamente aspecifici, realizzano la fase effettrice generalmente attraverso la fagocitosi, la degradazione ossidativa dei microrganismi fagocitati e la demolizione enzimatica delle proteine estranee, in maniera simile ai granulociti. La funzione effettrice di queste cellule è dunque condizionata quasi sempre dalla opsonizzazione del bersaglio che permette al fagocita di riconoscerlo come estraneo e di aderirvi. Sono gli anticorpi delle sottoclassi IgG1 e IgG3 le opsonine più efficaci, ma anche i fattori del complemento C3b e C3bi, grazie alla presenza sulla membrana dei fagociti dei recettori specifici FcγR, CR1 e CR3. In alcuni casi sembra tuttavia che i fagociti possano distruggere la cellula bersaglio anche grazie alla liberazione di enzimi proteolitici e di sostanze citolitiche del tipo delle perforine. Alcuni parassiti, cellule neoplastiche e cellule infettate da virus sono uccise dai macrofagi per citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) senza fagocitosi. I linfociti B infine, attaccano il bersaglio sia con Ig della stessa specificità di quelle utilizzate nella fase di riconoscimento dei siti antigenici esposti sul bersaglio sia con Ig specifiche per altri epitopi presenti nei peptidi prodotti dalla processazione del bersaglio stesso. Entrambi questi tipi di anticorpi sono liberati in circolo da specifiche plasmacellule originate da specifici cloni B linfocitari ciascuno attivato da un determinato epitopo antigenico. La distruzione della cellula bersaglio, avviata dalla reazione anticorpale è realizzata dal complemento.

2. Immunità Specifica ed Aspecifica

Tradizionalmente si distinguono due tipi di risposta immunitaria denominati:

specifica o acquisita e aspecifica o naturale. Il primo tipo viene inoltre distinto in immunità cellulare e umorale. Questo tipo di classificazione, se da una parte risponde ad esigenze di semplificazione didattica, dall'altra non rispecchia se non in maniera approssimativa la realtà della risposta immunitaria che si caratterizza per una specificità generale nel riconoscimento del self, e un grado differenziato di specificità nel riconoscimento dell'estraneo a seconda del tipo di cellula.

Viene detta aspecifica la difesa immunitaria di primo impatto realizzata da cellule fagocitarie (monociti-macrofagi e granulociti) che non hanno la capacità di riconoscere l'una dall'altra le strutture estranee, non possedendo il vasto repertorio recettoriale presente nei linfociti, e che non reagiscono in modo differenziato ai diversi antigeni. Tali cellule tuttavia devono anch'esse rispettare i requisiti generali sopra indicati e in particolare devono poter distinguere con elevata specificità le cellule e le strutture autologhe da quelle estranee. Questo tipo di specificità è ottenuto grazie al possesso da parte di queste cellule di recettori specifici per determinate molecole autologhe che hanno la proprietà di rivestire le molecole e le cellule estranee (opsonizzazione) con modalità differenti. In particolare le cellule fagocitarie possiedono recettori per il Fc delle immunoglobuline e per i fattori C3b, C3bi e C3d del complemento (v. fig.1).

Queste molecole intermediarie che aderiscono con specificità immunologica (immunoglobuline e fattori del complemento) o biochimica (fattori del complemento previa adesione di PCR e di altre proteine della fase acuta) alle strutture estranee, e non alle strutture autologhe, rendono possibile la differenziazione delle strutture non-self e la specificità della difesa immunitaria primaria sotto forma di fagocitosi (v. fig.1).

Le cellule killer naturali realizzano una risposta immunitaria che nella fase di riconoscimento ricalca in parte le modalità delle cellule fagocitarie (esse riconoscono infatti il bersaglio estraneo ricoperto da immunoglobuline in quanto possiedono recettori specifici per il Fc (Perussia e al. 1984), ma sono capaci anche di riconoscere direttamente senza molecole intermediarie alcune strutture presenti in virus e in cellule neoplastiche (Ortaldo 1988), come è illustrato nella fig.2.

Come le cellule fagocitarie non sembrano possedere recettori idiotipici che gli conferiscano una capacità di riconoscere specificamente i singoli antigeni. La fase effettrice è viceversa aspecifica nei due casi ed è realizzata dai macrofagi attraverso una demolizione enzimatica del materiale fagocitato (v. fig.1), che come sarà detto meglio più avanti, viene poi presentato sotto forma di peptidi alle cellule immunocompetenti (v. fig.1), e dalle cellule killer naturali mediante l'inserimento nella membrana delle cellule bersaglio di molecole di perforine che avviano il processo di lisi (v. fig.2) (Young e Cohn 1988).

L'immunità specifica è realizzata dai linfociti grazie al possesso di recettori idiotipici estremamente variabili da un clone linfocitario all'altro e tali da coprire praticamente tutta la gamma di antigeni esistenti. Tali recettori si configurano in immunoglobuline nel caso dei linfociti B e in recettori TCR clonotipici nel caso dei linfociti T. La specificità immunologica di queste cellule riguarda non solo la fase di riconoscimento, ma anche

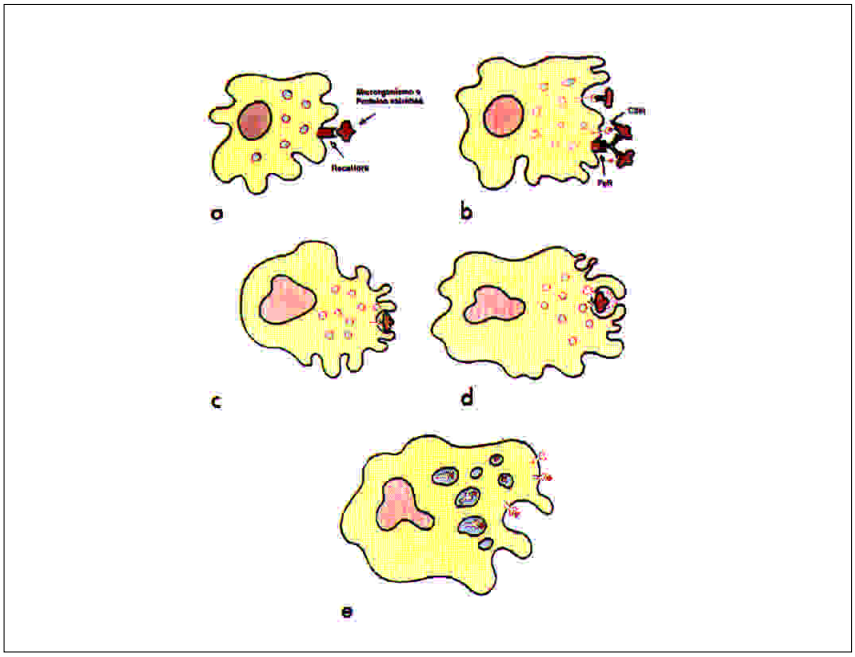


Figura 1. Fagocitosi, processazione e presentazione dell'antigene da parte del macrofago. a - Captazione per mezzo di recettori non specifici. b - Captazione, previa opsonizzazione, per mezzo di recettori specifici per C3b, C3bi e Fc. c - Inizio della fagocitosi. d - Fase successiva della fagocitosi con iniziale processazione dell'antigene. e - Captazione da parte di molecole HLA di classe II dei peptidi derivati dalla processazione dell'antigene, e presentazione sulla membrana del macrofago.

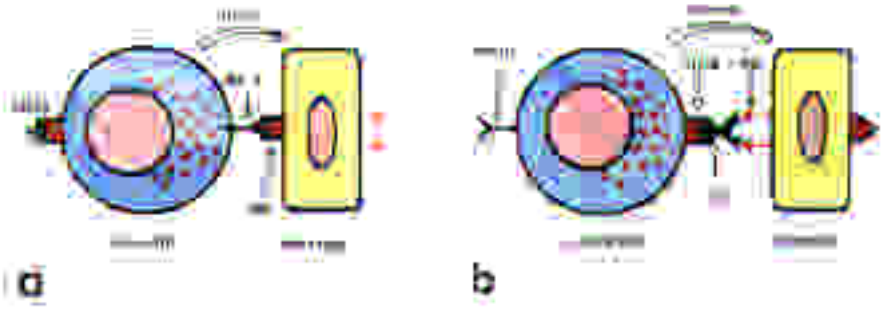


Figura 2. Attività citotossica delle cellule NK.
a - Riconoscimento specifico del bersaglio per mezzo del recettore NK-R
b - Riconoscimento anticorpo-mediato per mezzo del recettore CD16, con ADCC.
Per i dettagli della citolisi vedi testo.

la successiva fase effettrice. Questa è realizzata dai linfociti B attraverso la immissione in circolo di immunoglobuline con la stessa specificità idiotipica di quelle che avevano precedentemente operato il riconoscimento (v. fig. 3 e 4), e dai linfociti T direttamente per mezzo del recettore TCR che rimane sulla membrana cellulare (vedi anche fig. 22). Nel primo caso l'azione litica finale sul bersaglio è operata per attivazione del complemento o per fagocitosi, nel secondo caso per l'intervento di mediatori chimici, come perforine e altre leucocitolisine, prodotti dagli stessi linfociti T.

L'interconnessione tra i due tipi di immunità ora tratteggiati, umorale e cellulare, è notevole in quanto nella grande maggioranza dei casi l'attivazione dei linfociti B dipende da una preliminare cooperazione con i linfociti T (Abbas 1988). Solo in pochi casi (antigeni T-indipendenti) i linfociti B sono attivati direttamente alla produzione di immunoglobuline da antigeni circolanti senza l'intervento dei linfociti T (Male e al. 1988).

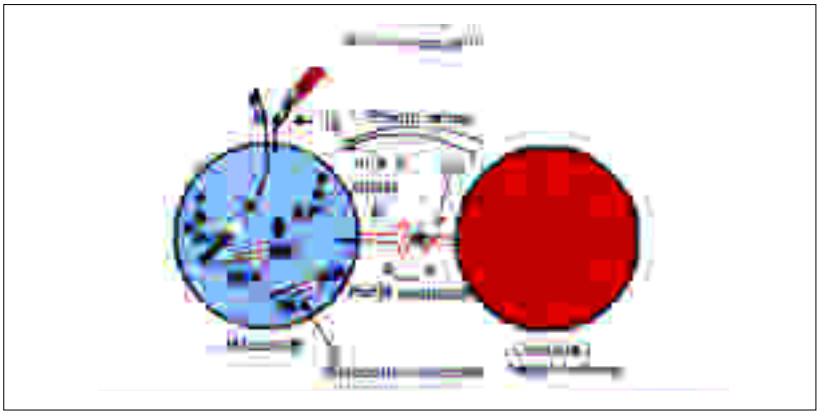


Figura 3. Captazione, processazione e presentazione dell'antigene al linfocita Th da parte del linfocita B. Interazione cellulare diretta TH-B per ponte peptidico, e risposta anticorpale.

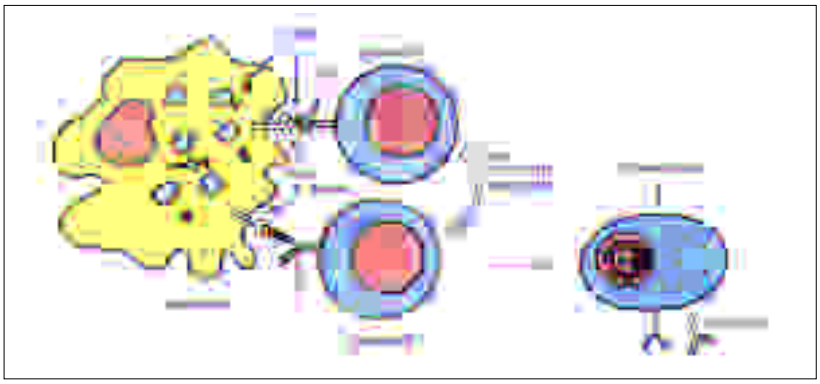


Figura 4. Interazione cellulare Th-B/Macrofago con produzione di linfochine e risposta anticorpale.

3. Le Cellule dell'Immunità

Sono rappresentate dagli effettori dell'immunità specifica e aspecifica, cioè dai linfociti e dalle cellule fagocitarie e presentanti gli antigeni (APC).

I linfociti sono una popolazione di cellule eterogenee per morfologia, origine, ontogenesi e differenziazione, distribuzione nei tessuti e organi linfoidi, tempo di sopravvivenza, funzione immunologica e fenotipo di membrana. Nell'adulto essi rappresentano il 30% circa dei leucociti totali del sangue periferico, dove ammontano mediamente a 12-14 x 10^9, mentre complessivamente nell'organismo raggiungono la cifra di 1 x 10^{12} - 1 x 10^{15}. Essi compaiono negli organi linfoidi primari (timo e midollo osseo nell'adulto) a un ritmo molto elevato (1 x 10^9 al giorno) e una parte migra successivamente nel sangue circolante fino ai tessuti linfoidi secondari. La loro vita media è molto variabile e alcuni linfociti maturi possono sopravvivere per molti anni, svolgendo un ruolo di cellule memoria. Sul piano morfologico i linfociti osservati al microscopio su uno striscio di sangue appaiono eterogenei per dimensione, potendo essere piccoli (<8μ), medi (8-10μ) e grandi (>10μ); per rapporto nucleo-citoplasmatico che è alto nel piccolo linfocita e basso nel grande linfocita; per i caratteri citochimici e per la presenza o meno di granuli azzurrofili. In microscopia ottica, dopo colorazione di May-Grunwald-Giemsa, si possono facilmente distinguere due tipi di linfociti maturi quiescenti: 1) il piccolo linfocita con nucleo rotondo, cromatina addensata, rapporto N/C molto elevato con citoplasma estremamente ridotto o non visibile; 2) il grande lin–focita con granuli (LGL) con nucleo reniforme, rapporto N/C basso e numerose granulazioni azzurrofile citoplasmatiche. La popolazione di piccoli linfociti è costituita essenzialmente da linfociti T e linfociti B, apparentemente identici in microscopia ordinaria, ma distinguibili per specifici marcatori di membrana e per la loro funzione. La popolazione dei grandi linfociti con granuli (LGL), che costituisce normalmente il 5-15% dei linfociti del sangue periferico è composta in grande maggioranza da linfociti non-T non-B, detti anche cellule nulle o cellule L. Queste ultime comprendono la quasi totalità dei linfociti con attività killer (cellule K) e killer naturale (cellule NK). Esistono dunque tre tipi di linfociti: i linfociti B che si sviluppano nel midollo osseo e che possono differenziarsi in cellule produttrici di anticorpi o plasmacellule; i linfociti T che si differenziano nel timo ed esercitano svariate funzioni come la cooperazione con i linfociti B per la produzione di anticorpi, l'induzione dell'attività battericida o citotossica di altre cellule dell'immunità, come i macrofagi, la distruzione di cellule infettate da virus, la modulazione dell'intensità delle risposte immunitarie; e i linfociti LGL che esercitano attività citotossica, sia mediata da anticorpi (ADCC) sia non mediata , contro cellule infettate da virus e cellule neoplastiche.

3.1. I Linfociti T

Si sviluppano e si differenziano nel timo, e dopo aver subito un processo selettivo che determina la delezione dei cloni auto-aggressivi, emigrano nei tessuti linfoidi periferici, dove svolgono in gran parte le loro funzioni. Essi governano la risposta immunitaria specifica cellulo-mediata e anticorpale T-dipendente grazie a strutture di riconoscimen-

to idiotipiche denominate TCR e associate sulla membrana alla glicoproteina CD3. In un piccolo numero di cellule i TCR sono eterodimeri γδ capaci di riconoscere antigeni estranei senza restrizione HLA, ma nella grande maggioranza dei linfociti T i TCR sono eterodimeri αβ che riconoscono siti antigenici di peptidi estranei presentati da molecole HLA self. Il riconoscimento dei peptidi da parte dei linfociti T realizza due obiettivi diversi a seconda che la struttura self coinvolta sia un antigene MHC di classe II oppure un antigene di classe I. Nel primo caso si tratta di linfociti T che possiedono il recettore CD4 (linfocita T helper-inducer) e nel secondo di linfociti T che possiedono il recettore CD8 (linfocita T soppressore-citotossico) (Blue e al. 1988). La funzione dei primi è essenzialmente quella di attivare, attraverso la produzione di linfochine diverse, l'attività effettrice (anticorpopoietica, citotossica, soppressiva) di altre cellule, mentre la funzione dei secondi si esercita o direttamente sulla cellula bersaglio che porta l'antigene specifico (attività citotossica), o indirettamente inibendo l'attività delle cellule citotossiche e/o dei linfociti B (attività soppressiva).

3.2. I Linfociti B

I linfociti B hanno come funzione principale quella di produrre gli anticorpi. Essi riconoscono l'antigene grazie alle Ig che esprimono in superficie e che rappresentano il marcatore che li caratterizza. Esistono però altri marcatori sulla superficie di queste cellule, come i prodotti di classe II del MHC, i recettori per la porzione Fc degli anticorpi, per i frammenti del C3 del complemento e per i fattori di accrescimento e di differenziazione delle cellule B. Questi marcatori saranno trattati dettagliatamente più avanti. I linfociti B riconoscono antigeni liberi circolanti, oltre che antigeni su membrane cellulari, (in particolare antigeni presentati da macrofagi nella zona marginale, per la risposta primaria, e antigeni presentati da cellule follicolari dendritiche per la risposta secondaria) e non necessitano di un contestuale riconoscimento del self. Col riconoscimento dell'antigene da parte dei recettori Ig il linfocita B realizza due funzioni distinte. La prima è quella di cellula presentatrice di antigeni (Ashwell 1988). Questa riguarda essenzialmente strutture antigeniche complesse, poliepitopiche, che in un primo tempo legano le Ig a ponte (cross-linking) sulla superficie cellulare, migrano verso un polo della cellula (capping) e quindi vengono internalizzate, processate nel citoplasma cellulare e riesposte sotto forma di oligopeptidi al successivo riconoscimento da parte di cellule T helper (v. fig. 3) e forse anche di altre cellule immunocompetenti sia T che B. In questa funzione le cellule B, sono più efficienti dei macrofagi, e grazie alla presenza sulla loro membrana di numerose Ig possono catturare antigeni (e quindi processarli e presentarli) anche quando la concentrazione di questi è molto bassa e le altre cellule APC rimangono inefficienti.

La seconda funzione è quella di cellula anticorpopoietica e riguarda generalmente peptidi antigenici prodotti dagli stessi B linfociti e presentati direttamente ai T helper, oppure prodotti dai macrofagi e presentati da questi ai B linfociti e ai Th (v. fig.4). In entrambi i casi i peptidi sono presentati da molecole MHC di classe II e i Th danno ai B linfociti il secondo segnale per l'anticorpopoiesi. Il linfocita B va incontro ad attivazione, ad amplificazione clonale, a differenziazione immunologica in plasmacellula, e libera

infine in circolo gli anticorpi specifici. Per produrre una risposta anticorpale le cellule B necessitano, in generale, non solo della presenza dell'antigene ma anche del concorso delle cellule Th specifiche di quest'antigene. Gli antigeni incapaci di indurre la produzione di anticorpi da parte delle cellule B senza l'aiuto delle cellule T sono chiamati antigeni T-dipendenti (T-dip.). Altri antigeni possono stimolare direttamente le cellule B senza l'intervento delle cellule T, e sono detti antigeni T-indipendenti (T-ind.). La maggior parte degli antigeni proteici sono T-dipendenti, mentre gli antigeni T-indipendenti sono spesso delle grosse molecole polimerizzate con dei determinanti antigenici ripetitivi. E' il caso degli idrati di carbonio e di altri antigeni non proteici. Certi antigeni T-ind. sono delle molecole capaci di attivare le cellule B in modo non specifico (attivatori policlonali delle cellule B). La risposta primaria dei linfociti B vergini dà luogo a maturazione e modesta amplificazione clonale, con produzione nettamente prevalente di IgM sia dopo stimolazione con antigeni T-ind. che T-dip. La risposta anticorpale secondaria diretta contro un antigene T-dip. è caratterizzata generalmente da maturazione e forte amplificazione clonale che esita in produzione elevata di IgG dotate di maggiore affinità per l'antigene, rispetto alle IgM. La risposta secondaria agli antigeni T-ind. non subisce questo tipo di maturazione e resta a predominanza IgM (v. fig. 5).

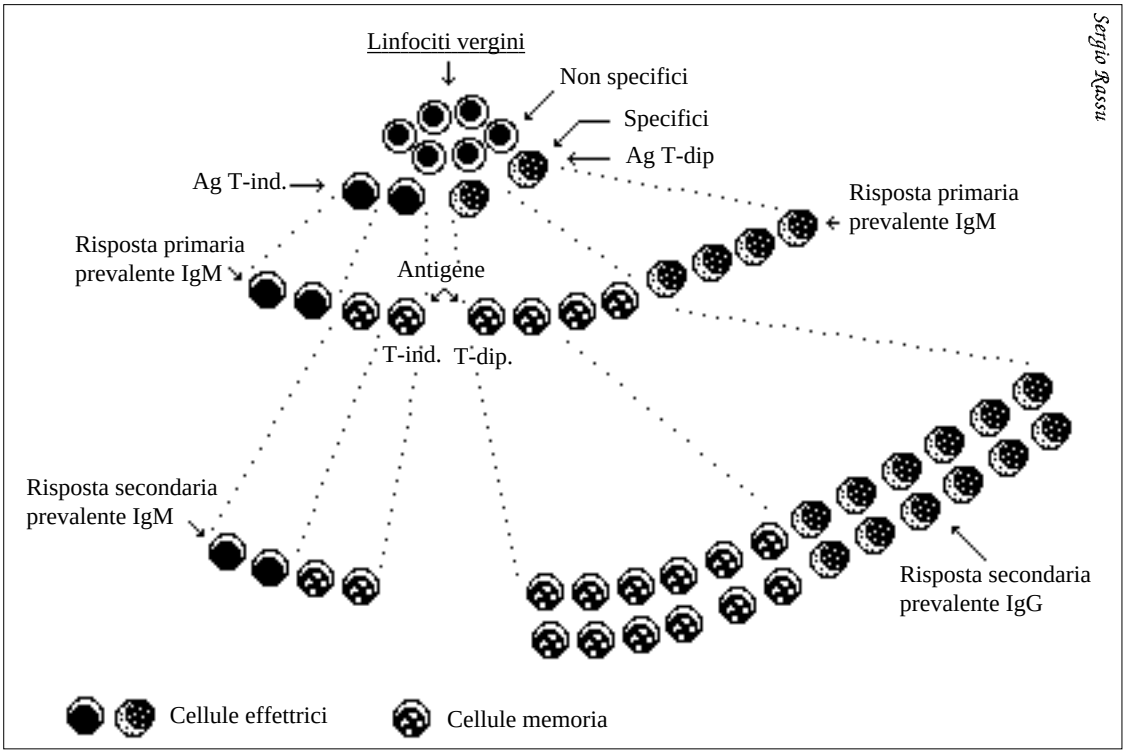


Figura 5. Risposta B linfocitaria primaria e secondaria e amplificazione clonale dopo stimolo con antigeni T dipendenti (Ag T-dip.) e T indipendenti (AgT-ind.).

Secondo certi dati ottenuti nel topo, il riconoscimento degli antigeni T-dip. e T-ind. sarebbe effettuato da popolazioni di cellule B distinte, differenziate per il marcatore di superficie Lyb5. Le cellule B attivate proliferano, poi subiscono una maturazione sotto l'influenza delle cellule T e si differenziano in plasmacellule.

3.3. I Linfociti LGL

Rappresentano una popolazione eterogenea di linfociti non ancora completamente caratterizzata né sul piano funzionale né per i markers di membrana che essi possiedono. Comprendono cellule con attività citotossica anticorpo-dipendente (ADCC) o cellule killer (K) e cellule LAK. In grande maggioranza esse si identificano nelle cellule killer naturali (NK), corrispondenti morfologicamente ai linfociti LGL, definite funzionalmente in vitro per l'attività specifica sulla cellula bersaglio K 562, e immunologicamente per avere un profilo recettoriale $CD3^-$ $CD16^+$ che tuttavia non è esclusivo di queste cellule e che non le comprende tutte come sarà meglio precisato in un apposito paragrafo. Queste cellule non esprimono eterodimeri TCR αβ o γδ e non riarrangiano i rispettivi geni. La loro funzione è essenzialmente una funzione citotossica non strettamente specifica che si esercita su cellule bersaglio infettate da virus o su cellule neoplastiche. La realizzazione di questo obiettivo necessita della capacità da parte di queste cellule di identificare una o più strutture specifiche nel bersaglio. Questa capacità sembra risiedere almeno in parte in un recettore NK-R recentemente identificato mediante anticorpi monoclonali (Ortaldo 1988). Le cellule NK sono anche capaci di attività citotossica mediata da frazioni del fattore C3 del complemento o da IgG (attività ADCC). In questa funzione le strutture di riconoscimento sono il CR3 e il recettore specifico per l'Fcγ caratterizzato mediante anticorpi monoclonali come CD16 (Perussia e al. 1984).

3.4. Le Cellule Fagocitarie

Appartengono a questa categoria i granulociti neutrofili, i monociti del sangue periferico e diversi tipi di cellule del sistema reticolo-istiocitario presenti in tutti i tessuti, come i macrofagi alveolari, le cellule di Kupffer del fegato, le cellule microgliali del cervello, i fagociti del mesangio renale, le cellule A della sinovia, i macrofagi cutanei, i macrofagi linfonodali residenti e ricircolanti. Queste cellule riconoscono le sostanze estranee per mezzo di recettori per le frazioni del complemento C3b, C3bi e C3d e per il fattore Fc delle IgG. I granulociti sono cellule a vita breve che circolano nel sangue prima di passare nei tessuti dove effettuano la fagocitosi e muoiono. I monociti invece sono cellule a lunga vita che migrano dal sangue nei tessuti dove si trasformano in macrofagi. Questi hanno un maggior potere fagocitario dei monociti a causa del numero più alto dei loro recettori di membrana e dispongono di una più grande quantità di enzimi lisosomiali. L'attività fagocitaria e la conseguente demolizione enzimatica del materiale fagocitato rappresentano la prima barriera aspecifica della difesa immunitaria.

3.5. Le Cellule presentanti l'antigene o APC

E' un'espressione comunemente adoperata per indicare cellule del sistema monocito-macrofagico dotate della capacità di presentare l'antigene ai linfociti in una forma che può essere riconosciuta, e dunque immunogenica. Il fatto che cellule completamente diverse, come i linfociti B, siano dotate della capacità di presentare l'antigene suggerisce di utilizzare il termine di APC nel suo significato funzionale anziché per indicare una particolare categoria di cellule. Parliamo pertanto qui di cellule monocitarie-macrofagiche presentanti l'antigene. Queste cellule fagocitano gli antigeni e li trasportano lungo il sistema linfatico negli organi linfatici secondari (milza e linfonodi). Gli antigeni processati sono qui presentati sotto forma di peptidi oligo-epitopici ai linfociti.

I macrofagi della zona marginale della guaina linfatica periarteriolare (PALS = periarteriolar lymphatic sheath) della milza e del seno marginale dei linfonodi captano antigeni T-indipendenti, come polisaccaridi, che vi persistono a lungo. Pertanto tali cellule presentano gli antigeni principalmente ai B linfociti senza restrizione HLA. I monociti sono caratterizzati dalla presenza degli antigeni di superficie DR, FcγR, CD21, CD35, CD4, CD13, CD14, CD11c, ICAM-1, CD25, CD71. I macrofagi si differenziano dai monociti per la perdita degli antigeni CD13.

Le cellule follicolari dendritiche sono grandi cellule con lunghe protuberanze citoplasmatiche presenti nei follicoli dei linfonodi e della milza dove formano l'intelaiatura del centro germinativo. Esse captano gli antigeni in forma di immuno-complessi fissanti il complemento, grazie alla presenza sulla membrana di recettori per Fc e C3b, e li presentano principalmente ai B linfociti. Questo meccanismo di presentazione sembra importante per lo sviluppo delle cellule memoria. Presentano sulla membrana le molecole DR, FcγR, CD21, CD35, ICAM-1, Mac-1, VLA-β1 e VCAM-1 e DRC-1.

I macrofagi residenti e ricircolanti, prevalenti i primi nelle zone marginali e i secondi nella midollare dei linfonodi e nella polpa rossa splenica, fagocitano grazie ai recettori per le sottounità C3b, C3bi e C3d e per il Fc delle IgG, presentano i peptidi dopo processazione ai linfociti T e B di solito in associazione con antigeni HLA di classe II.

Le cellule di Langerhans sono cellule ricircolanti presenti a livello cutaneo, dove captano l'antigene e, senza fagocitarlo, lo trasportano ai linfonodi regionali dove divengono cellule dendritiche interdigitate. Presentano l'antigene ai linfociti T in associazione con molecole HLA di classe II. Esprimono sulla membrana gli antigeni HLA di classe II e i recettori FcγR, CD1, CD4 e ICAM-1.

Le cellule dendritiche interdigitate sono localizzate nell'area paracorticale del linfonodo. Particolarmente ricche in antigeni HLA di classe II esse sono molto attive nella presentazione degli antigeni ai linfociti T helper-inducer. Sembrano molto importanti nello sviluppo di reazioni da ipersensibilità ritardata. Esprimono sulla membrana gli antigeni DR, FcγR, (CD4), ICAM-1 e (CD71), LFA-1α, LFA-1β, LFA-3, VCAM-1, CD44.

Le cellule "nurse" sono cellule dendritiche del timo circondate da linfociti. Non hanno recettori per C3 e Fc, non fagocitano e non ricircolano. Presentano antigeni in associazione con molecole MHC di classe I e II ai timociti. Sembrano importanti nello sviluppo del repertorio delle cellule T.

Altre cellule, come cellule dell'endotelio capillare e alcune cellule endocrine possono presentare antigeni in determinate circostanze che inducono l'espressione di molecole MHC di classe II sulla membrana.

4. Organi e Tessuti Linfoidi

I linfociti, i monociti, i macrofagi e le altre cellule accessorie sono in gran parte localizzati in speciali strutture (organi, e tessuti linfoidi), dove sono in generale compartimentalizzati, in maniera non stabile, in aree anatomiche specifiche (homing). I linfociti circolano continuamente in questi organi e tessuti, tramite i vasi sanguigni e linfatici, realizzando quello che è definito traffico o ricircolazione linfocitaria.

Gli organi linfoidi si distinguono in organi centrali, nei quali i linfociti si sviluppano e maturano, e organi periferici, nei quali sono attivati e avviano la risposta immunitaria. La ricircolazione continua consente ai linfociti di svolgere la funzione di pattugliamento dell'organismo o sorveglianza immunitaria.

Gli organi linfoidi centrali sono il midollo osseo, che è la sede di origine di tutti i linfociti e della maturazione dei B linfociti, e il timo dove i timociti subiscono la selezione, la differenziazione e la maturazione fino alla realizzazione del repertorio definitivo di linfociti T immunocompetenti.

Gli organi linfoidi periferici sono i linfonodi, la milza, il tessuto linfoide cutaneo e i MALT (tessuti linfoidi associati alle mucose).

4.1. Midollo Osseo

Il midollo osseo assume alla nascita la funzione ematopoietica, che nell'embrione umano è svolta inizialmente nel sacco vitellino e successivamente, nel corso della vita fetale, nel fegato. Tutte le cellule del sangue derivano da una comune cellula staminale pluripotente localizzata, dopo la nascita, nel midollo osseo, denominata anche CFU-LM (v. schema Fig. 6) e riconoscibile per la presenza sulla membrana del CD34. Questa è programmata per differenziarsi nelle diverse linee cellulari, cioè mieloide, eritroide, piastrinica, monocitaria, e linfoide. Specifiche citochine, denominate colony-stimulating factors (CSF), stimolano la proliferazione e la maturazione dei precursori di ciascuna serie. Tuttavia i fini meccanismi che regolano l'evoluzione della cellula staminale nei vari precursori e successivamente fino alle cellule mature non sono ancora ben conosciuti. Un ruolo essenziale è svolto dal microambiente midollare nel quale operano cellule stromali (c. reticolari, c. avventiziali, adipociti, etc.) e cellule non stromali (linfociti, macrofagi) che producono le diverse citochine in gioco. Un'esposizione di questi aspetti esula comunque dagli scopi di questo lavoro.

4.2. Timo

E' un organo bilobato situato nel mediastino anteriore. Ciascun lobo, circondato da una capsula, è diviso in lobuli da setti fibrosi e ciascun lobulo è formato da una corticale esterna e da una midollare interna (v. fig. 7).

La corticale contiene in prevalenza cellule T proliferanti relativamente immature densamente stipate, mentre la midollare contiene un minor numero di cellule T (in

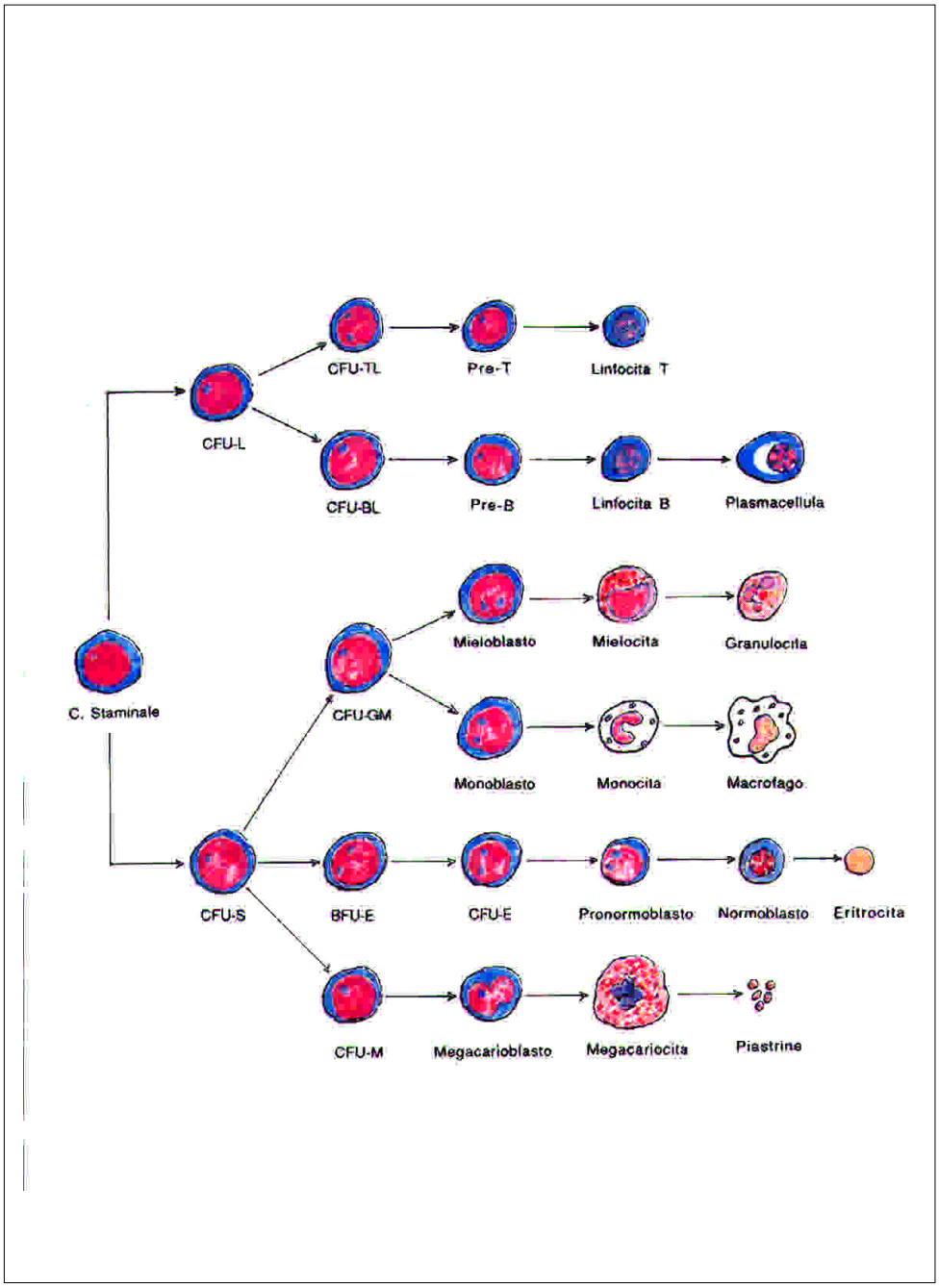


Figura 6. Schema della differenziazione delle cellule del sangue a partire da una comune cellula staminale totipotente.

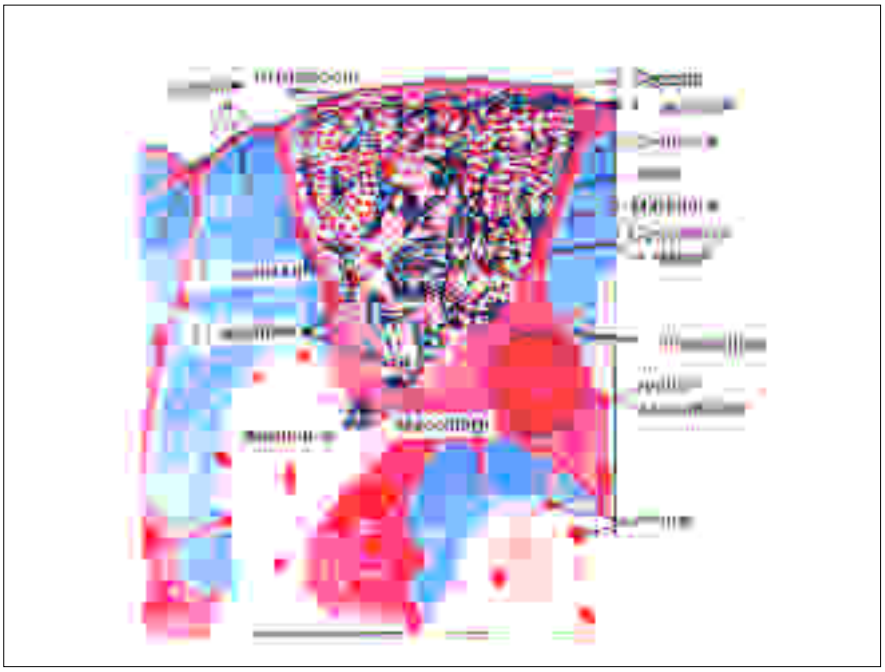


Figura 7. Timo. Organizzazione schematica dei lobuli.

maggioranza più mature (timociti maturi, pre-timociti). Sparse nel timo sono cellule epiteliali specie tra i lobuli, e cellule dendritiche e macrofagi. Nella midollare esistono delle strutture denominate corpuscoli di Hassall composte da spirali di cellule epiteliali sottilmente impaccate, in gran parte in degenerazione. Il timo ha una ricca rete vascolare e dei vasi linfatici efferenti che hanno origine nella midollare e drenano nei linfonodi mediastinici. Delle arcate vascolari che costituiscono la via di accesso per i precursori timici e la via di efflusso per i linfociti T maturi, demarcano la giunzione cortico-midollare. I precursori (pro-timociti) penetrano nella corticale timica in corrispondenza della giunzione cortico-midollare. I pre-timociti vanno incontro a un processo ontogenetico caratterizzato da espressione successiva sulla membrana di marcatori (CD), da riarrangiamento del TCR e differenziazione in Tγδoαβ, come schematicamente mostrato nella fig. 16 e esposto nel paragrafo apposito.

Le cellule immature migrano dalla corticale nella midollare dove entrano in contatto con cellule epiteliali, macrofagi e cellule dendritiche, esprimono il complesso TCR/CD3 sulla membrana e acquisiscono le caratteristiche del timocita maturo. In questa fase, come verrà meglio detto più avanti, i timociti attraverso il contatto con le cellule nurse vanno incontro a un processo di selezione positivo HLA dipendente che comporta la morte o l'eliminazione funzionale della maggiore parte delle cellule rappresentate da cellule con TCR specifico per strutture MHC non-self.

Un secondo processo di selezione (selezione negativa) riguarda le cellule T con TCR specifico per antigeni self. Anche questo processo porta alla eliminazione di una

proporzione rilevante di linfociti T. Le cellule rimanenti sono così caratterizzate da TCR specifici per l'MHC self e per antigeni non-self. Nella midollare sono così presenti timociti maturi e dei linfociti T maturi differenziati in cellule $CD4^+$ $CD8^-$ o $CD4^-$ e $CD8^+$ che lasciano rapidamente il timo per entrare nel sangue, nella linfa e successivamente negli organi linfoidi periferici.

Il timo va incontro a involuzione fisiologica con l'età e dopo la pubertà è difficile da localizzare. Tuttavia la selezione e la maturazione dei linfociti continua a lungo nell'adulto. Questo indica che sono presenti per lungo tempo nell'adulto residui del timo funzionanti, oppure che sia possibile una maturazione e una selezione positiva extratimica. Tuttavia finora non esiste nessuna prova di quest'ultima possibilità.

4.3. Linfonodi

I linfonodi rappresentano il tessuto linfoide periferico più importante e quantitativamente più rilevante. Sono la sede elettiva di filtrazione e screening degli antigeni estranei drenati con la linfa da tutti i tessuti del corpo, e insieme alla milza la sede principale di filtrazione e screening degli antigeni estranei presenti nel sangue. Sono distribuiti in tutto l'organismo lungo i vasi linfatici. Il linfonodo ha una architettura relativamente semplice (Fig. 8).

Schematicamente è organizzato in quattro principali strati o aree anatomiche e funzionali: 1) Area esterna, di afflusso e di raccolta della linfa contenente linfociti, e

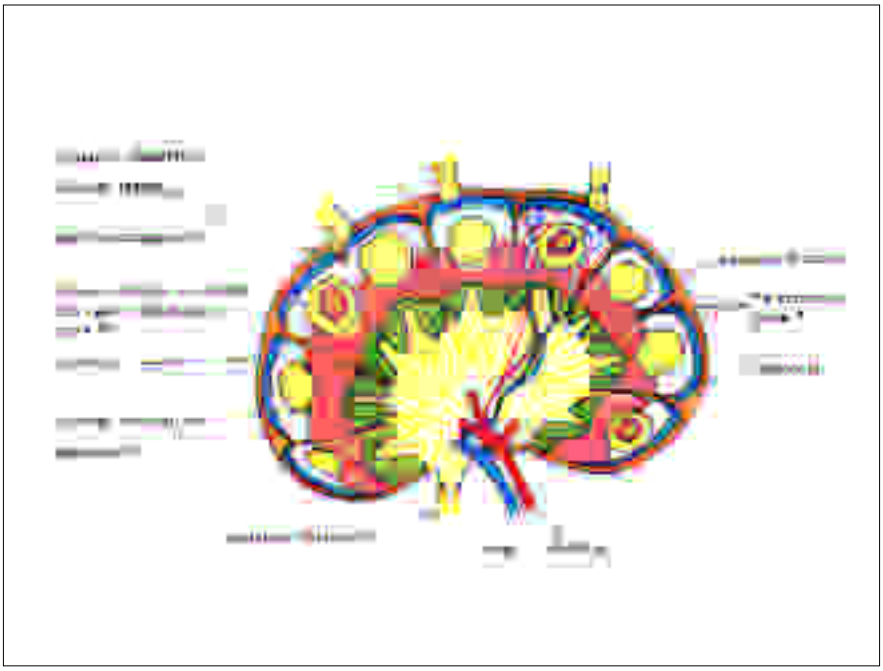


Figura 8. Raffigurazione schematica di un linfonodo.

eventualmente antigeni, provenienti dai tessuti circostanti e da linfonodi adiacenti. Questa è costituita dal seno marginale subcapsulare che circonda l'area corticale ed è ricoperta da una capsula fibrosa esterna perforata da numerosi vasi linfatici afferenti che versano appunto la linfa nel seno marginale. Questo è rivestito da cellule fagocitarie. 2) Area corticale, di concentrazione, attivazione e proliferazione dei linfociti B (area B). Questa contiene degli aggregati rotondeggianti di linfociti B maturi disposti intorno a cellule follicolari dendritiche (follicoli) la grande maggioranza dei quali presentano una zona centrale più chiara di linfociti B attivati e proliferanti (centro germinativo) e sono denominati follicoli secondari. I follicoli sprovvisti di centro germinativo sono denominati follicoli primari e contengono linfociti B maturi apparentemente non stimolati di recente da antigeni. Negli spazi interfollicolari e, in piccolo numero, anche nei follicoli sono presenti linfociti T, in maggioranza CD4+ frammisti con pochi $CD8^+$. 3) All'interno della corticale si trova la paracorticale (area T) che contiene principalmente linfociti T, molti dei quali sono in stretto contatto con cellule interdigitate ricche di molecole MHC di classe II (cellule APC). 4) Area centrale o midollare (area di cellule T e B), nella quale si addentra il tessuto linfoide dalla paracorticale, sotto forma di cordoni, lungo i tralci delle fibre connettive che uniscono la midollare con la capsula esterna.

I cordoni midollari contengono, oltrechè linfociti T e B, la maggior parte delle plasmacellule del linfonodo, e sono separati tra loro da ampi seni (seni midollari) rivestiti da macrofagi che rimuovono le particelle antigeniche dalla linfa durante il passaggio di questa nel linfonodo verso il linfatico efferente. Questo è situato nell'ilo del linfonodo e raccoglie insieme alla linfa tutti i linfociti che lasciano il linfonodo. Ciascun linfonodo dispone di una sua vascolarizzazione con un'arteria e una vena situate nell'ilo in vicinanza del vaso linfatico efferente. L'arteria porta all'interno del linfonodo i linfociti. Questi in corrispondenza delle venule post-capillari ad alto endotelio (HEV), situate principalmente nella paracorticale (talvolta anche nella corticale, mai nella midollare), lasciano il circolo sanguigno attraversando le cellule endoteliali delle HEV e penetrano nel tessuto linfonodale circostante. Nei centri germinativi i linfociti B maturi stimolati dall'antigene vanno incontro ad attivazione, proliferazione clonale, e differenziazione.

L'attivazione dei linfociti B vergini inizia probabilmente nella zona paracorticale dove i linfociti abbandonano il torrente circolatorio e passano nel tessuto linfonodale. Qui l'antigene viene presentato ai linfociti B vergini dalle cellule interdigitate in presenza di linfociti T helper. I linfociti B attivati producono Ig che si legano all'antigene formando degli immuno-complessi (IC). Questi filtrano nei follicoli primari insieme a linfociti B attivati e a linfociti B vergini, ai quali vengono presentati dalle cellule follicolari dendritiche sotto forma di complessi di 0.3 - 0.4 μ di diametro denominati "iccosomi". Così i linfociti B attivati sono continuamente esposti agli antigeni presentati in forma di IC sulla membrana delle cellule follicolari dendritiche, e realizzano i centri germinativi (follicoli secondari) proliferando attivamente, amplificandosi clonalmente e differenziandosi in linfociti B memoria o in plasmacellule. Nei centri germinativi si può distinguere un'area scura, di più attiva proliferazione, in cui si trovano gli immunoblasti, i centroblasti e i macrofagi contenenti residui di linfociti fagocitati (i cosiddetti tingible body macrophages), un'area chiara contenente i centrociti, e tutt'intorno un mantello o

corona di piccoli linfociti B maturi residenti in cui si accumulano i linfociti B memoria. I linfociti B in questa sede sono ricchi di IgD sulla membrana. Le plasmacellule sono invece rare nei centri germinativi ed è probabile dunque che la loro formazione dagli immunoblasti avvenga in gran parte fuori dai centri germinativi, forse nei cordoni midollari dove si trovano in gran numero. La formazione dei centri germinativi è T-dipendente, come dimostra la loro assenza nei pazienti con deficit congenito di linfociti T (sindrome di Di George) e nei topini "nudi" congenitamente atimici o timectomizzati alla nascita.

E' difficile stabilire se la formazione dei centri germinativi dipende dai linfociti T $CD4^+$ presenti nei follicoli. Questi rappresentano il 5% circa della popolazione follicolare totale, esprimono l'antigene CD57 e non producono IL-2 dopo stimolazione. E' importante tener presente che i follicoli linfoidi contengono oltrechè linfociti B, T $CD4^+$ e macrofagi, anche cellule follicolari dendritiche. Queste costituiscono appena il 2% delle cellule follicolari totali ma sono indispensabili per la formazione dei follicoli. Esse forniscono innanzitutto un supporto strutturale intorno al quale possono organizzarsi i linfociti B. Come abbiamo già ricordato, hanno la proprietà di fissare sui recettori per Fc e per C3b, di cui sono particolarmente ricche, un gran numero di IC che presentano per lungo tempo ai linfociti B e T helper favorendo l'attivazione dei linfociti B maturi e la proliferazione clonale dei linfociti B attivati e dei B memoria. Sono principalmente dislocate alla periferia dell'area chiara dei centri germinativi e i loro prolungamenti si addentrano nel mantello. La durata complessiva del ciclo cellulare dei linfociti B nei follicoli è di circa 6 ore. L'attività proliferativa nei centri germinativi dipende dalla loro età. I centri giovani contengono molti centroblasti e centrociti (rispettivamente grandi e piccole cellule centrofollicolari), mentre i vecchi centri germinativi ne contengono pochi. Le cellule B proliferanti nei centri germinativi si distinguono per la forma del nucleo in cellule clivate e non clivate. Questo carattere, insieme a quelli già ricordati (morfologia, sede e fenotipo) è stato utilizzato per la definizione delle neoplasie linfoidi.

I meccanismi responsabili della compartimentalizzazione di differenti tipi di linfociti in differenti aree non sono del tutto chiari. E' probabile che essi risiedano in gran parte nelle interazioni dei linfociti con altri linfociti o con altre cellule e, in particolare con cellule endoteliali e con la matrice extracellulare, dovute a molecole di adesione. Un ruolo importante in questo deve essere attribuito alle Selectine e alle Integrine (v. capitolo 6).

4.4. Milza

E' l'organo linfoide più voluminoso dell'organismo, localizzato nel quadrante superiore sinistro dell'addome dietro lo stomaco e sotto il diaframma. E' circondata da una capsula di tessuto collageno che si addentra in forma di trabecole fibrose nel parenchima. Queste trabecole, con la rete di fibre reticolari fanno da supporto ai vasi arteriosi e venosi e alle cellule compartimentalizzate nell'organo (Fig. 9).

Ci sono due principali tipi di tessuto: la polpa rossa che funge essenzialmente da filtro e da tessuto emocateretico, contiene seni venosi separati da cordoni splenici o cordoni di Billroth, nei quali si trovano numerosi macrofagi fagocitici, piastrine, linfociti

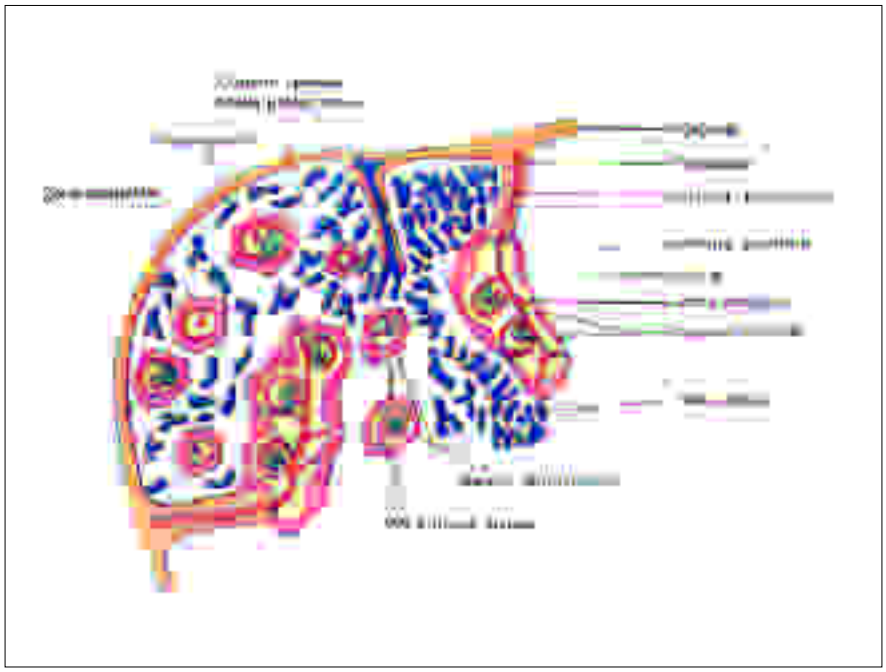


Figura 9. Rappresentazaione schematica di una sezione di milza.

e numerose plasmacellule, e la polpa bianca che è la sede del tessuto linfoide. Il grosso del tessuto linfoide è disposto intorno a un'arteriola centrale in aggregati chiamati PALS (periarterioral lymphoid tissue). Il PALS è composto di aree concentriche di cellule: un'area T che circonda l'arteriola centrale e contiene circa 2/3 di T helper CD4+ e 1/3 di T $CD8^+$, una area B rotondeggiante generalmente eccentrica rispetto all'arteriola e inclusa nell'area T, ma ben distinta da questa, e infine una zona marginale che circonda le 2 aree di linfociti e separa i PALS dalla polpa rossa. Le cellule B possono essere organizzate sia in follicoli primari (cellule non stimolate dall'antigene) sia in follicoli secondari con un centro germinativo, come nei linfonodi (cellule B attivate e proliferanti). Nei centri germinativi si trovano anche cellule dendritiche e macrofagi fagocitici. I macrofagi specializzati si trovano nella zona marginale che circonda i PALS. Questi, insieme con le cellule follicolari dendritiche dei follicoli primari sono le cellule che presentano gli antigeni ai linfociti B. I linfociti entrano ed escono liberamente nei PALS per mezzo dei rami capillari delle arteriole centrali nella zona marginale e in questa zona si trovano perciò sia linfociti B che T.

Alcuni dei linfociti B presenti in questa zona esprimono sIgM e non esprimono mai sIgD. E' possibile che queste cellule abbiano una funzione importante nella risposta agli antigeni T-indipendenti. Alcuni linfociti specialmente plasmoblasti in via di maturazione possono passare attraverso la zona marginale nella polpa rossa.

Il sangue penetra nei tessuti con una arteria trabecolare che diviene l'arteria centrale

e si divide in molti rami. Alcuni giungono nella polpa bianca fino al mantello e al centro germinativo, ma la maggior parte arriva dentro la zona marginale o vicino ad essa. Altri ancora scorrono direttamente nella polpa rossa e terminano nei cordoni splenici. I seni venosi drenano il sangue nelle vene della polpa e quindi nelle vene trabecolari. La struttura del sistema vascolare splenico assicura condizioni ottimali per lo svolgimento delle due funzioni essenziali della milza, cioè la funzione emocateretica e quella immunologica.

4.5. Altri tessuti linfoidi periferici

Oltrechè nei linfonodi e nella milza, aggregati di linfociti, alcuni dei quali con una precisa struttura anatomica, si trovano in molti tessuti, e particolarmente nelle aree mucose e nella cute.

1) Il sistema immune delle mucose consiste di ammassi di linfociti, macrofagi e altre cellule accessorie, non delimitati da una capsula, localizzati sotto la mucosa, oppure distribuiti diffusamente come linfociti intraepiteliali. Gli aggregati di tessuto linfoide associati alle mucose (MALT), anatomicamente definiti, comprendono gli ammassi focali della lamina propria, le placche di Peyer dell'intestino tenue e i follicoli linfoidi dell'appendice, che nell'insieme costituiscono il GALT (gut-associated lymphoid tissue), le tonsille, e i follicoli linfoidi sottomucosi delle vie aeree superiori e dei bronchi, e del tratto urogenitale.

Le placche di Peyer appaiono macroscopicamente come piccole placche pallide sulla parete intestinale e sono ricoperte da una mucosa che manca delle cellule caliciformi e possiede invece un epitelio specializzato comprendente una particolare cellula detta cellula membranosa M. Questa è permeabile agli antigeni ed è specializzata nel trasporto degli antigeni al tessuto linfoide. Anche le IgA prodotte dalle plasmacellule locali sono trasportate nel lume intestinale. Le placche di Peyer comprendono aree di cellule B e T e possono avere centri germinativi. E' presente in questa struttura un numero molto elevato di linfociti B e di plasmacellule che producono IgA. I linfociti penetrano nelle aree linfoidi delle placche di Peyer per mezzo delle HEV. Le tonsille e i tessuti linfoidi delle vie aeree superiori e del tratto uro-genitale contengono una grande quantità di linfociti riuniti generalmente in molti grandi centri germinativi.

2) Il sistema immune cutaneo consiste di linfociti intraepidermici e di linfociti e cellule accessorie intradermiche. Esso garantisce efficaci risposte immuni nei confronti degli antigeni applicati topicamente. Una cellula di particolare importanza in questo sistema è la cellula di Langherans (v. anche pag. 16) che dopo aver captato l'antigene migra negli organi linfoidi periferici dove evolve in cellula dendritica interdigitata e presenta l'antigene ai linfociti T helper mediante molecole MHC di classe II. La presenza in queste cellule dell'antigene CD1, molecola MHC-like di classe I, ne fa prevedere un ruolo come cellula bersaglio di linfociti T con TCRγδ.

5. Homing e Traffico Linfocitario

I linfociti circolano continuamente tra gli organi e i tessuti linfoidi e i tessuti extralinfoidi mediante i vasi sanguigni e linfatici. Ogni ora ricircola circa l'1-2% del pool totale dei linfociti memoria, e gli organi che lo sostengono in modo prevalente sono la milza, con un flusso di 2.5 x 10^{11} linfociti / die, e i linfonodi con un flusso di circa 0.5 x 10^{11} linfociti / die. La circolazione linfocitaria risponde a due esigenze immunologiche essenziali, cioè la sorveglianza immunitaria, assicurata appunto dal libero passaggio dei linfociti in tutti i tessuti dell'organismo, e la risposta immunitaria agli antigeni estranei garantita dalle interazioni strette che i linfociti T e B contraggono tra loro e con le cellule accessorie del sistema immunitario negli organi linfoidi secondari, grazie alla particolare struttura di questi e alla loro ricchezza in molecole di adesione. L'incremento dello stato di adesività al quale i linfociti vanno incontro dopo il contatto con gli antigeni specifici, e la diminuzione di esso al termine della risposta immunitaria, sono elementi essenziali di questa capacità dei linfociti di assolvere alle loro due funzioni. La circolazione linfocitaria non avviene in modo casuale, ma è regolata in modo differenziale e selettivo in aree anatomiche definite per le diverse cellule, verosimilmente in rapporto con il fenotipo di membrana di queste. Nell'insieme questo processo comporta che un grande numero di linfociti antigene-specifici si localizza nel compartimento di pertinenza dei tessuti ed organi linfoidi periferici (homing) ed entra qui in contatto con gli antigeni appropriati. Così i linfociti B sono prevalentemente convogliati nella milza e nei MALT, mentre i linfociti T migrano di preferenza nei linfonodi. All'interno degli organi linfoidi, come è stato già precisato, i linfociti B e i linfociti T hanno una differente compartimentalizzazione che è strettamente correlata con le loro funzioni. Questo è molto importante poiché i linfociti sono monospecifici (cioè ciascun linfocita riconosce con le sue strutture idiotipiche un solo antigene) e solamente un numero limitato di essi è normalmente capace di riconoscere una particolare conformazione antigenica. Il passaggio dei linfociti dal sangue allo strato paracorticale e corticale dei linfonodi, nelle placche di Peyer e nelle tonsille, avviene a livello delle venule postcapillari in siti particolari in cui il vaso è rivestito da endotelio alto (HEV) ricco di particolari molecole di adesione (molecole di homing), come selectine e integrine. Queste sono responsabili di un rallentamento del flusso dei linfociti che, dopo un breve contatto, attraversano l'endotelio nelle giunzioni tra cellula e cellula, immettendosi nel tessuto linfatico e localizzandosi nelle rispettive aree di pertinenza. E' interessante notare che le HEV si sviluppano da venule endoteliali piatte probabilmente per effetto di citochine prodotte da linfociti T stimolati da antigeni, come sembra provare il fatto che 1) tali formazioni mancano negli animali che crescono in ambiente privo di germi e negli animali con deficit totale di T linfociti, e 2) le HEV ridiventano venule a endotelio piatto quando, mediante taglio chirurgico dei linfatici afferenti viene impedito l'ingresso degli antigeni al linfonodo.

Nella milza, i cui vasi mancano di tali strutture vascolari, i linfociti passano liberamente per mezzo dei sinusoidi dal circolo nei PALS, a livello della zona marginale da dove i B e i T linfociti raggiungono le rispettive aree di pertinenza, con meccanismi non ben conosciuti.

E' molto probabile che anche nei PALS esistano delle molecole di adesione simili alle selectine e alle integrine, che fungono da ligandi per gli homing-receptors presenti sulla membrana dei linfociti (integrine e altre adesine). A queste molecole è dedicato un capitolo specifico al quale si rimanda per maggiori dettagli.

Gli homing-receptors sono ovviamente essenziali per le interazioni che i linfociti devono contrarre con altre cellule e con la matrice extracellulare, nel microambiente degli organi e tessuti linfoidi, per poter effettuare l'homing. Alcuni homing-receptors come il LFA-1 sembrano conferire ai linfociti proprietà di homing non selettivo, mentre altri, come il MEL-14, il GMP-140 e l'ELAM-1 sembrano responsabili di homing distrettuale. Il CD44, un homing-receptor di 80-90 kD, presente sui linfociti umani, riconosce le HEV di tutti i tessuti linfoidi, quelle indotte nella sinovia dall'infiammazione e quelle presenti in tessuti non linfoidi, come per es. i neuroni. Altri homing-receptors sono dotati di selettività per le HEV di tessuti linfoidi differenti, così, esistono dei linfociti con proprietà di homing intestinale che migrano di preferenza a livello delle HEV del GALT (linfociti che esprimono VLA-4), altri che migrano specificamente nei linfonodi mesenterici (in particolare quelli che esprimono la selectina MEL-14), oppure in altri linfonodi, e altri ancora nella milza. Tuttavia come abbiamo già ricordato, le HEV non sono strutture statiche permanenti, e gli eventi che regolano la transmigrazione e l'homing dei linfociti sono probabilmente più complessi. Prove crescenti indicano che una cascata di interazioni adesive tra linfociti e cellule endoteliali regola tali fenomeni per effetto di citochine prodotte da stimoli antigenici e infiammatori. Anche lo stadio maturativo e funzionale dei linfociti è importante. Così, i linfociti memoria migrano preferenzialmente in organi e tessuti periferici, come la pelle, e i linfociti vergini in strutture linfoidi organizzate, come i linfonodi. E' interessante osservare che il comportamento dei linfociti negli animali adulti è differente da quello dei neonati per quanto riguarda la ricircolazione. I primi quando provengono da specifici linfonodi mostrano una tendenza doppia a ritornare in linfonodi dello stesso tipo di quelli di provenienza. Questo potrebbe suggerire che l'attivazione da parte di specifici antigeni incontrati in precedenza può modificare il fenotipo di membrana dei linfociti inducendoli a una ricircolazione selettiva verso il tipo di organo linfoide secondario in cui l'antigene era stato prima incontrato.

I linfociti, portati insieme alla linfa e alla grande maggioranza degli antigeni dei vasi linfatici, penetrano in grande prevalenza nel seno marginale dei linfonodi con i vasi linfatici afferenti e filtrano successivamente nelle diverse aree linfoidi del linfonodo. Il ritorno dei linfociti dagli organi e dai tessuti linfoidi alla circolazione avviene nei linfonodi mediante i vasi linfatici efferenti e il dotto toracico, e nella milza e negli altri tessuti linfoidi attraverso il sistema venoso.

6. Le Molecole di Adesione del Sistema Immunitario

Come è stato già detto nel paragrafo sul homing e il traffico linfocitario, le cellule del sistema immunitario, e in particolare i linfociti, per poter efficacemente assolvere alla loro funzione di pattugliamento dell'organismo e di sorveglianza nei confronti dell'ingresso di agenti infettivi estranei, devono poter circolare liberamente nel sangue e nella linfa, ma per poter rispondere adeguatamente agli agenti estranei penetrati nell'organismo devono poter migrare attraverso i tessuti, dirigersi negli organi linfoidi, attraversare le barriere di endoteli e di membrane basali per aggregarsi nei siti di infezione, e aderire alle cellule che portano l'antigene estraneo.

Nel primo caso (sorveglianza) i linfociti si comportano come cellule non-aderenti, e nel secondo caso (risposta immune) come cellule aderenti. Il rapido passaggio dei linfociti dallo stato di cellule non-aderenti a quello di cellule aderenti, provocato dalla presenza nell'organismo di agenti estranei, e all'inverso dallo stato di cellule aderenti a quello di cellule non-aderenti, conseguente all'esaurimento della risposta effettrice, è condizione essenziale della capacità di difesa del sistema immunitario. Questo cambiamento di condizione dei linfociti dipende dalla espressione transitoria sulla loro membrana di molecole con proprietà adesive indotta dall'attivazione da parte di antigeni estranei (Springer 1990). É stato dimostrato che alla base del cambiamento di adesività dei linfociti esiste una modificazione delle cariche elettriche negative sulla membrana cellulare: una riduzione delle cariche negative si accompagna a maggiore adesività e viceversa. La risposta immunitaria è condizionata fortemente dalla possibilità che le cellule immunocompetenti entrino in intimo contatto tra loro e con le cellule bersaglio sia nella fase di riconoscimento che in quella effettrice. Queste interazioni adesive sono garantite da un grande numero di molecole di adesione, la cui espressione sulla membrana cellulare dipende per alcune di esse dallo stato funzionale della cellula.

Nell'insieme tali molecole sono denominate adesine e sono suddivise in quattro famiglie principali, che sono:

1- La superfamiglia delle Immunoglobuline, che comprende molte molecole con proprietà adesive, e in particolare i recettori antigene-specifici dei T linfociti (TCR αβ e γδ) e dei B linfociti (Ig), le molecole MHC, CD2, CD3, CD4 e CD8 (v. tab. 1);

2. La famiglia delle Integrine, che hanno un ruolo importante nell'adesione extracellulare e sono cruciali nella regolazione dinamica della migrazione e dell'homing (v. tab. 2);

3. La famiglia delle Selectine, ad azione simile alle lectine, che hanno un ruolo prevalente nell'adesione dei linfociti all'endotelio vascolare e nella loro migrazione selettiva (v. tab. 3);

4. Le H-CAM il cui ruolo è simile a quello delle Selectine, ma sono meno ben conosciute.

Nome	**Subunità**	**Ligando**	**Distribuzione Cellulare**
LFA-2 (CD2)	1	LFA-3	Timociti, T, NK
LFA-3 (CD58)	1	LFA-2	Leucociti
ICAM-1 (CD54)	1	LFA-1*	Su molti tipi di cellule attivate, leucociti, FDC e c. endoteliali
		ICAM-2 -	1 LFA-1* C. endoteliali e leucociti
VCAM-1 (INCAM-110)	1	VLA-4*	Cellule endoteliali e FDC
CD3-TCR1	(γ,δ,ε,ζ,η)-γ/δ	Ag-CD1	T
CD3-TCR2	" -α/β	Ag-MHC	T
CD4	1	MHC classe II	T, M, Ma, Timociti
CD8	α/α, α/β	MHC classe I	T, Timociti, NK
CD28	α/α	B7	T
MHC classe I	α/β2-m	CD8	Molto larga
MHC classe II	α/β	CD4	B, T attivati, altre cellule attivate

**Molecole appartenenti alla famiglia delle integrine*
T = linfociti T, NK = cellule killer naturali, M = monociti, Ma = macrofagi, B = linfociti B, FDC = cellule follicolari dendritiche

Tabella 1. Recettori di adesione della superfamiglia delle Ig.

6.1. La Superfamiglia delle Immunoglobuline

Appartengono a questo gruppo numerose proteine caratterizzate dalla presenza di uno o più dominî Ig (unità di omologia), cioè di sequenze di 90-100 aa. omologhe ai dominî V o C delle immunoglobuline. Alcune di queste, riportate nella tabella seguente, svolgono funzioni di molecole di adesione.

Di queste molecole e del loro ruolo nei fenomeni di attivazione e di cooperazione cellulare che sono alla base del riconoscimento dell'antigene e della risposta effettrice, e delle loro principali caratteristiche strutturali, si parlerà in successivi paragrafi e dettagliatamente nella seconda parte di questo lavoro (Arras e Contu 1992). Esse sono anche coinvolte in interazioni cellulari adesive strettamente coordinate tra loro pur differenziandosi nei fattori inducenti, nel tipo di cellule in gioco, nelle condizioni responsabili della loro espressione e della loro avidità per il corrispondente ligando, e nella funzione immunologica che garantiscono.

Subfamiglie	Integrine Nome	Cluster	Subunità	Ligandi		Funzioni		Distribuzione Cellule Leucociti	Altre	Legame a RGD**
$\beta 1_{49}$	VLA-1*	CDw49a/CD29	$\alpha 1\beta 1$	LM., COL	-	Ad.C-M	-	B^a, T^a	F, MB	-
(CD49/CD29)	VLA-2	CDw49b/CD29	$\alpha 2\beta 1$	“”	-	“	-	T^a,M,LAK	P,F,EN,EP	-
	VLA-3	CDw49c/CD29	$\alpha 3\beta 1$	“”	FBN	“	-	-	F, EP	-
	VLA-4	CDw49d/CD29	$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1	“	“	Hom.T	B,T,M,NK	CN, F	-
	VLA-5	CDw49e/CD29	$\alpha 5\beta 1$	-	“	“	-	Timoc., T	F,EP,EN,P	+
	VLA-6	CDw49f/CD29	$\alpha 6\beta 1$	LM	-	“	-	T	P, EN	-
$\beta 1_{51}$	$\alpha V/\beta 1$	CD51/CD29	$\alpha V\beta 1$		FBN			-	CN, F	+
(CD51/CD29)										
$\beta 2$	LFA-1	CD11a/CD18	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, 2		Ad. leuc.		B,T,M,G, NK	-	-
(CD11/CD18)	Mac-1, CR3	CD11b/CD18	$\alpha M\beta 2$	iC3b, F.X, FBG		Ad. leuc., iC3b-R		M, G, NK	-	+?
	p150,95, CR4	CD11c/CD18	$\alpha X\beta 2$	iC3b		“		M, G, NK	-	?
$\beta 3$	gpIIb/IIIa	CD41/CD61 LM, TSP, COL	$\alpha IIb\beta 3$	FBG, FBN, vWF, VN,		Ad. e Aggregati Piastrine		-	P, EN	+
	VNR	CD51/CD61	$\alpha V\beta 3$	VN, FBG, vWF, TSP		?		Ba, M	EN	+
	LIR	CD-/CD61	$\alpha R\beta 3$	FBN, VN		Aumento fagocitosi neutrofili		M, G	-	?
$\beta 4$	$\alpha E\beta 4$	CD49f/CD-	$\alpha 6\beta 4$	?		Ad. C-M		-	EP	-
$\beta 5$	$\alpha V\beta S$	CD51/CD-	$\alpha V\beta 5$	VN, FBN		“ “		M	K, F, EP	+
$\beta 6$	LPAM-2	CD49d/CD-	$\alpha 4\beta p$	?		Ad. L-Placche Peyer		T	-	?

*Very late activation; **RGD = segnale di adesione Arginina-Lisina-Ac. aspartico (v. pag. 35)

Legenda:LM = Laminina; COL = Collageno; Ad.C-M = Adesione cellula-matrice; FBN = fibronectina; F.X = Fattore X della coagulazione; FBG = fibrinogeno; vWF = fattore di Von Willebrand; VN = Vitronectina; TSP = trombospondina; Hom. T = homing T linfociti; L = linfociti; B = linfociti B; B^a= linfociti B attivati; T = linfociti T; T^a = linfociti T attivati; M = monociti-macrofagi; NK = cellule Killer Naturali; Lak = cellule NK attivate; G = granulociti; F = fibroblasti; MB = membrana basale; P = piastrine; EN = cellule endoteliali; EP = cellule epiteliali; CN = cresta neurale; K = carcinoma.

Tabella 2. Famiglia delle Integrine .

Nome	**Ligando**	**Distribuzione Cellulare**	**Funzione**
MEL-14 (LAM-1 o Leu 8)	Polisaccaridi su HEV-PN	Linfociti, G. neutrofili	Recettore per: Migrazione selettiva dei linfociti dal sangue ai linfonodi periferici. Compartimentalizzazione dei linfociti T nella paracorticale, e dei linfociti B nei follicoli primari.
ELAM-1	Polisaccaridi linfociti e neutrofili	C. endoteliali attivate	Media l'adesione di linfociti e neutrofili su c. endoteliali.
PADGEM (GMP-140 o CD62)	"	C. endoteliali attivate, Piastrine	Media l'adesione di neutrofili e monociti su c. endoteliali e piastrine.

Tabella 3. Famiglia delle Selectine.

6.1.1. Adesione da attivazione antigene-dipendente

Come è stato già detto, l'adesività dei linfociti è ostacolata dalla presenza di forti cariche elettriche negative sulla membrana cellulare che esercitano un effetto repulsivo impedendo uno stretto contatto tra le cellule. La riduzione delle cariche elettriche negative, parallela alla riduzione delle molecole di ac. sialico sulla membrana cellulare, si accompagna a un aumento di adesività delle molecole deputate a tale tipo di attivazione (Springer 1990). I meccanismi attraverso i quali si può ottenere una riduzione delle cariche elettriche negative, e quindi un allargamento delle aree di contatto intimo tra le cellule sono svariati. Quello più rilevante è rappresentato dalla attivazione cellulare indotta dal contatto tra il complesso TCR-CD3 e l'antigene peptidico presentato da una molecola HLA. Alla stabilizzazione di questo contatto contribuiscono le molecole CD4 e CD8, rispettivamente co-recettori delle molecole MHC di classe II e di classe I. Gli antigeni TCR e i co-recettori si spostano sulla membrana T-cellulare indipendentemente l'uno dall'altro fino a quando sono riuniti dal riconoscimento del complesso peptide-MHC. In assenza del riconoscimento di un antigene le molecole CD4 e CD8 non dimostrano normalmente adesività nei confronti delle molecole MHC. Il loro ruolo non si esaurisce nella stabilizzazione del contatto TCR/Ag-MHC, ma è anche quello di trasduttori di segnali. Questa funzione sembra dipendere dall'associazione del

loro segmento intracitoplasmatico con una tirosina-chinasi linfocita-specifica che è codificata nel locus LCK del cromosoma 1°. L'attivazione dipendente dal riconoscimento dell'antigene si esplica in modo coordinato e sinergico con l'interazione di altre molecole di adesione con i rispettivi ligandi, e in particolare di CD2 con LFA-3 e di ICAM-1 con l'LFA-1. Entrambe queste coppie di molecole sono in grado di garantire una certa adesione indipendentemente dall'attivazione antigene-dipendente, ma essa viene da quest'ultima accentuata, e viceversa, attraverso la trasduzione diretta o mediata di segnali all'interno della cellula. La loro espressione sulla membrana cellulare determina un cambiamento di stato delle cellule da quello di cellule circolanti a quello di cellule adesive capaci di localizzarsi nelle sedi linfonodali e/o tessutali in cui deve svolgersi la funzione immunologica effettrice. Ciò dipende da situazioni diverse capaci di incrementare l'adesività cellulare indipendentemente dal riconoscimento antigenico.

6.1.2. Adesione da attivazione antigene-indipendente

É rappresentata essenzialmente dall'interazione adesiva tra la molecola CD2 e il suo ligando LFA-3, e tra la molecola CD28 e il suo ligando B7. La prima è stata messa in evidenza grazie al fenomeno delle rosette che i linfociti T formano con gli eritrociti autologhi che esprimono sulla membrana la molecola LFA-3. Questo tipo particolare di rosette si forma in vitro solamente con i linfociti T attivati $CD2^+$ e non con i linfociti T a riposo. Il passaggio dei linfociti T dallo stato di riposo allo stato di attivazione determina la comparsa sulla molecola CD2 dell'epitopo CD2.3 che è appunto coinvolto, insieme all'epitopo CD2.1, anche se con minore affinità, nella formazione delle classiche rosette T con le emazie di pecora. L'interazione CD2-LFA-3 fa aumentare la risposta immune T-cellulare nei confronti dell'antigene fino a 30 volte, grazie al sinergismo già precedentemente ricordato tra i segnali trasmessi all'interno della cellula dal CD2 in seguito al contatto con l'LFA-3 e dal complesso CD3-TCR in seguito al contatto con l'antigene.

L'interazione adesiva tra l'antigene T-cellulare CD28 e l'antigene di attivazione B-linfocitario B7 è un secondo esempio di adesione antigene-indipendente. Questa sembra importante nella cooperazione T-B linfociti, e in particolare per la regolazione da parte dei T-linfociti delle risposte B-cellulari antigene specifiche.

6.1.3. Adesione da attivazione infiammazione-indotta

Questo tipo di interazione adesiva è stato identificato attraverso un test di adesione omotipica in cui cellule dello stesso tipo aderiscono l'una all'altra formando degli aggregati multicellulari. É stato dimostrato che tale fenomeno è dovuto a un'interazione tra la molecola ICAM-1 o CD54, appartenente alla superfamiglia delle Ig e il suo recettore specifico LFA-1, appartenente alla famiglia delle integrine. La molecola ICAM-1 è espressa in condizioni normali in un piccolo numero di cellule, ma in caso di infiammazione compare sulla membrana di molte cellule di tessuti diversi. In particolare i mediatori dell'infiammazione IL-1, IFN-γ, TNF e LPS causano una forte induzione

di ICAM-1, favorendo così l'adesione, sui tessuti che la esprimono, dei linfociti e dei monociti che possiedono il recettore LFA-1 sulla membrana. L'espressione della molecola ICAM-1 nei diversi tipi di cellule può essere indotta da citochine diverse e questo può differenziare il tipo di infiltrazione leucocitaria nei tessuti interessati dall'infiammazione (Seth e coll. 1991). L'importanza immunologica di questa molecola è dimo–strata da diversi fenomeni tra i quali la sua espressione nei B linfociti attivati, che con–tribuisce, attraverso l'adesione omotipica, alla formazione dei centri germinativi dei linfonodi e degli altri tessuti linfatici, e dal suo contributo all'attività citotossica T-cellulare, dimostrato attraverso l'inibizione di questa da parte di anticorpi monoclonali anti-ICAM-1.

La possibilità di inibire determinati test di adesione cellulare del tipo ora descritto con anticorpi monoclonali anti-LFA-1 ma non anti-ICAM-1, ha permesso di identificare un secondo ligando per LFA-1 denominato ICAM-2. Questa molecola strutturalmente diversa da ICAM-1 in quanto possiede due dominî di tipo Ig (ICAM-1 ne possiede 5), si comporta in modo diverso anche per quanto riguarda l'espressione, che è essenzialmente limitata alle cellule endoteliali e non è influenzata da mediatori dell'infiammazione.

L'adesione cellulare dovuta all'interazione di ICAM-1 o ICAM-2 con LFA-1 sembra essere particolarmente importante nella citotossicità dei T-linfociti sui loro bersagli. Il tempo necessario ai T-linfociti per attaccare la cellula bersaglio, ucciderla, staccarsi da questa e attaccare una seconda cellula bersaglio è di appena 1-5 minuti. Questa rapida modulazione dell'adesività dei linfociti T non sembra dipendere dalle molecole ICAM-1 e ICAM-2 la cui avidità è costante e la cui espressione sulla membrana cellulare può aumentare per induzione da citochine solo dopo un lungo periodo di tempo che va da 4-6 ore a 12-24 ore. Essa è invece da attribuire essenzialmente a cambiamenti di avidità della molecola LFA-1. Questa infatti raggiunge mediamente il suo massimo livello entro 5-6 minuti dopo la stimolazione del TCR da parte del complesso MHC-peptide e ritorna al minimo livello dopo 30 minuti, rendendo così possibile un rapido alternarsi di adesione e de-adesione dei T linfociti al bersaglio. Così in assenza di una specifica stimolazione antigenica diminuisce l'adesività dei linfociti T, i quali possono ricircolare liberamente assolvendo efficacemente alla funzione di immunosorveglianza. Al contrario, il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR determina, grazie alla trasduzione del segnale all'interno della cellula, un forte incremento dell'avidità di LFA-1 e quindi una maggiore adesione del linfocita T al bersaglio. In questo senso la molecola LFA-1 è stata anche definita un servo-motore di adesione controllato dal TCR.

Recentemente è stato descritto un altro membro della superfamiglia delle immunoglobuline con funzione adesiva denominato VCAM-1 o INCAM-110. Il suo ligando è l'integrina VLA-4 (CD49d / CD29) espressa sui linfociti a riposo, su monociti e su cellule nervose. Il VCAM-1 è espresso sulle cellule endoteliali per effetto di mediatori dell'infiammazione con una cinetica simile a quella di ICAM-1. L'interazione tra VCAM-1 e VLA-4 rappresenta un altro meccanismo di adesione endotelio-linfocita simile a quello già ricordato dovuto all'interazione LFA-1 / ICAM-1 o 2 (Fig. 10).

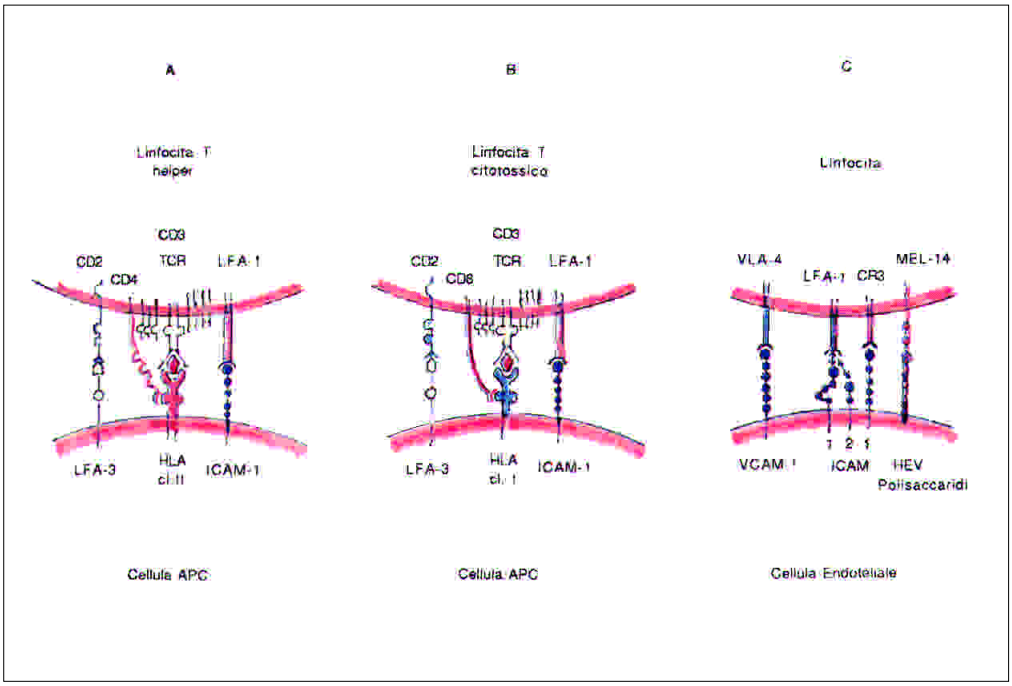


Figura 10. Interazioni molecolari adesive antigene-dipendenti (A, B) e antigene-indipendenti (C).
A = interazione tra linfocita T helper e cellule APC (l'antigene è presentato da una molecola HLA di classe II);
B = interazione tra linfocita T citotossico e cellula APC (l'antigene è presentato da una molecola HLA di classe I);
C = interazione tra linfocita e cellula endoteliale (HEV).

6.2. La famiglia delle Integrine

Un quadro completo delle principali caratteristiche delle molecole di adesione appartenenti alla famiglia delle integrine è dato nella tabella 2. Si tratta di una famiglia di molecole responsabili di interazioni adesive tra cellule oppure tra cellula e matrice extracellulare. Sono tutte glicoproteine integrali di membrana, eterodimeriche, composte da una catena α e una catena β associate tra loro da legami non covalenti. Undici delle 12 catene α e 3 delle 6 catene β che compongono le integrine finora note sono state identificate come markers di superficie, con una precisa denominazione CD. Le integrine attualmente conosciute sono 16 e sono suddivise in 6 subfamiglie distinte ciascuna da una diversa catena β.

Le integrine appartenenti a una determinata subfamiglia hanno la stessa catena β e

si differenziano per la catena α. Cosi, per una data catena β, possono esserci differenti eterodimeri di conformazione e specificità recettoriali diverse. La sottofamiglia β1 è rappresentata da 7 differenti integrine tutte composte da un'identica catena β (CD29) e da un catena α differente. Questa è rappresentata in 6 di esse da una variante della molecola CDw49 (a, b, c, d, e, f) e in una dalla molecola CD51. Le prime 6 sono state denominate VLA (very late activation) poiché le prime due della serie (VLA-1 e VLA-2) compaiono sui linfociti 2-4 settimane dopo la stimolazione antigenica in vitro. Alcune di esse però sono costantemente presenti sulla membrana dei leucociti, e la loro espressione sulle cellule non ematopoietiche non necessita di attivazione. Le integrine VLA-1, VLA-2, VLA-3 e VLA-5 vengono espresse sui leucociti dopo che questi attraversano la barriera endoteliale, e ne assicurano così la localizzazione nei siti di infiammazione.

I ligandi delle integrine appartenenti a questa subfamiglia si trovano in molecole della matrice extracellulare e precisamente nella laminina (VLA-1, VLA-2, VLA-3 e VLA-6), nel collagene (VLA-1, VLA-2, VLA-3) e nella fibronectina (VLA-3, VLA-4, VLA-5). Solamente l'integrina VLA-4 è recettore di un ligando espresso sia sulla matrice extracellulare (fibronectina) che sulle cellule endoteliali, ed è coinvolta oltrechè nella ricircolazione linfocitaria anche nella citotossicità T cellulare. Il suo ligando, (VCAM-1) appartenente alla superfamiglia delle Ig, si trova nella fibronectina in un sito differente da quelli su cui si legano VLA-3 e VLA-5.

Le integrine di questa subfamiglia sono espresse, oltrechè su linfociti T (alcune anche su linfociti B, NK e monociti), su un gran numero di cellule non ematopoietiche (v. tabella 2). Questo, insieme al fatto che i loro ligandi si trovano in componenti della matrice extracellulare, fa ritenere che esse abbiano un ruolo generale nell'organizzazione dei tessuti. Un'integrina β1 si differenzia dalle altre in quanto la sua catena α è la molecola CD51, e non una variante del CDw49. Viene perciò distinta nella denominazione (αV/β1) dal gruppo delle VLA. E' espressa su fibroblasti e su cellule della cresta neurale. Il suo ligando è la fibronectina. La sua funzione non è ancora definita.

La subfamiglia β2 è costituita da 3 molecole eterodimeriche che hanno in comune la catena β (CD18) e si differenziano tra loro nella catena α (CD11a, CD11b, CD11c) (Arnaout 1990). La loro espressione è limitata ai globuli bianchi. L'osservazione di casi di LAD (leukocyte adhesion deficiency) dovuti a mancanza congenita di espressione di queste integrine nei leucociti, per mutazioni nella catena comune CD18 ha dimostrato la loro importanza. I pazienti vanno incontro a infezioni ricorrenti, spesso fatali, poiché i granulociti neutrofili hanno perduto la proprietà chemiotattica e sono incapaci di dirigersi nei siti di infezione, per cui non c'è formazione di pus. La sindrome è ovviamente correggibile col trapianto di midollo osseo.

La subfamiglia β3 è per ora costituita da tre integrine la cui catena β è la molecola CD61. Delle tre catene α che le differenziano, due sono state identificate nelle molecole CD41 (integrina gpIIb/IIIa) e CD51 (integrina VNR), mentre la terza non è ancora identificata (integrina LIR). Queste integrine sono espresse essenzialmente nelle piastrine, nei monociti, nei granulociti, nei B linfociti e nelle cellule endoteliali. Esse assicurano interazioni adesive tra cellule e matrice extracellulare dove sono situati i loro ligandi (v. tabella 2).

Altre tre catene β (β4, β5 e βp), non definite come specificità CD, si associano rispettivamente con le catene α6 (CD49f), αV (CD51) e α4 (CD49d), caratterizzando le subfamiglie β4, β5 e β6 delle integrine. Anche queste sono espresse su varie cellule ematiche e non ematiche e sembrano avere un ruolo nelle adesioni extracellulari.

Le integrine sono strutturate in tre regioni, una extracellulare, una transmembrana e una intracitoplasmatica. La regione extracellulare, deputata all'interazione col corrispondente ligando, è a sua volta strutturata in vari dominî (da 3 a 7) sia nella catena α che nella catena β, e contiene dei motivi molecolari capaci di riconoscere nel ligando dei segnali per l'adesione e per la specificità. Il segnale di adesione è rappresentato per la maggior parte delle integrine dalla sequenza aa. arginina-glicina-ac. aspartico (RGD). Tale sequenza è presente in numerose proteine della matrice extracellulare e in particolare nel collagene, nella fibronectina, nella vitronectina, nel fattore C3bi, nel fattore X, nel fibrinogeno, nel fattore di von Willebrand, nella laminina, nella trombospondina, e nell'osteopontina. Altre sequenze aa. possono fungere per alcune integrine da segnale di adesione.

I segnali di specificità per il riconoscimento dei ligandi da parte delle diverse integrine non sono ancora definiti. E' possibile che sequenze aa. circostanti a RGD abbiano un ruolo importante nel modificare la conformazione del sito di adesione e conferirgli specificità, oppure che la specificità sia dovuta a un secondo sito riconosciuto da ciascuna integrina nel ligando. Varie sequenze delle catene α e β delle integrine sembrano essere coinvolte nel legame con i ligandi. Una sequenza 109-171 sembra importante nelle subunità β1 , β2 e β3. In un'altra sequenza (294-314) sulla subunità α CD41 sembra risiedere un sito di legame dei cationi bivalenti che è molto importante per l'interazione delle integrine con i ligandi. Le tre catene α (CD11a, b, c) delle integrine leucocitarie e la catena α dell'integrina VLA-2 hanno un dominio di 200 aa. denominato "inserto" o dominio "I" che sembra essere un ulteriore sito di riconoscimento dei ligandi, caratterizzato da alta omologia con i repeats che si legano con il collageno, con i fattori del complemento C2 e B, con il fattore di von Willebrand, e con altre proteine.

Le porzioni transmembrana delle integrine sono altamente conservate e sembrano avere un'attività modulante della trasmissione del segnale. Le porzioni intracitoplasmatiche sono brevi e caratterizzate da siti di fosforilazione tirosinici di sicura importanza funzionale. Esse sembrano interagire con il citoscheletro contraendo rapporti con la talina di modo che le integrine possano operare da trasduttori bidirezionali di segnali tra l'esterno e l'interno della cellula.

6.3. La Famiglia delle Selectine

Si tratta di una classe di molecole di adesione monomeriche rappresentata finora da tre proteine integrali di membrana (v. tabella 3) responsabili di interazioni tra linfociti (anche granulociti neutrofili e monociti) e cellule endoteliali e quindi della migrazione selettiva dei linfociti nei linfonodi e della loro particolare compartimentalizzazione all'interno dei linfonodi. Le selectine sono costituite da una porzione extracellulare dalla quale dipende la loro adesività, una porzione transmembrana e una porzione intracitoplasmatica. La prima contiene un dominio N-terminale di 117-120 aa. omologo

a varie lectine animali Ca++-dipendenti, come i recettori epatici del galattosio, lectine solubili leganti il mannosio, e il recettore a bassa affinità delle IgE (CD23). Segue al dominio N-terminale un dominio di 30-40 aa. rappresentato da una sequenza simile al fattore di crescita dell'epidermide (sequenza EGF). Successivamente delle brevi sequenze ripetitive di consenso di 62 aa., simili a quelle presenti in molte proteine dell'attivazione del complemento (SCR), in numero differente da una selectina all'altra, uniscono la porzione extracellulare delle selectine alla porzione transmembrana. Il numero di sequenze ripetitive è di 2 nella proteina MEL-14, 6 nella proteina ELAM-1 e 9 nella proteina CD62. Il numero di queste sequenze sembra possa servire per localizzare l'estremo N-terminale lectinico della molecola in siti di legame a varia distanza dalla membrana. Questo potrebbe tradursi in un differente tempo di trasmissione del segnale. Tutte e tre le selectine aiutano a regolare il legame dei leucociti all'endotelio nei siti di infiammazione. Questa funzione è svolta in particolare dalla molecola MEL-14 che per di più funge da recettore per la ricircolazione linfocitaria. Una molecola HSP, l'ubiquitina, sembra far parte del recettore MEL-14. La selectina ELAM-1 è transitoriamente espressa sulle cellule endoteliali attivate da IL-1 o da altri agenti infiammatori, ed è responsabile di una adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali differente da quella mediata dalle integrine leucocitarie e dalla molecola ICAM-1. L'IL-8, che è secreta dalle cellule endoteliali attivate, agisce sui neutrofili inibendone il legame alla molecola ELAM-1. L'insieme dei dati indica che entrambe le molecole MEL-14 e ELAM-1 agiscono in fase precoce nel legame dei neutrofili all'endotelio, prima della migrazione transendoteliale. Benché sia le selectine che le integrine possano regolare l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali, quando le selectine mediano tale adesione, le integrine sono ancora necessarie per il successivo evento di migrazione transendoteliale. La terza selectina, GMP-140 o CD62 è accumulata sia nelle piastrine che nelle cellule endoteliali in particolari granuli dai quali viene liberata dopo stimolazione da parte della trombina (e di altri prodotti della cascata coagulatoria). La sua successiva esposizione sulla membrana delle piastrine o delle cellule endoteliali determina l'adesione su queste cellule dei neutrofili e dei monociti.

6.4. La famiglia delle H-CAM

Il componente meglio conosciuto è il recettore CD44 o HERMES (PGP-1), che è presente nei linfociti T e pre-B, e in molte altre cellule. E' un homing receptor presente nei linfociti come glicoproteina transmembrana di 90 kD. Una variante proteoglicanica di 150-200 kD è presente in altre cellule. Il suo ligando è l'ac. ialuronico della matrice extracellulare, ma può mediare anche interazioni tra cellule.

7. Processazione, Trasporto e Presentazione degli Antigeni

La difesa T linfocitaria si effettua generalmente su bersagli costituti da peptidi presentati da molecole HLA di classe I. Le cellule CTL devono da una parte riconoscere specificamente il complesso peptide-molecola HLA, e dall'altra devono ricevere un segnale di attivazione e di amplificazione da parte di linfociti T helper-inducer che hanno già interagito con peptidi presentati da molecole HLA di classe II. Questo implica che le proteine estranee siano sottoposte a un processo di demolizione in piccoli peptidi all'interno della cellula, di trasporto e di cattura da parte delle molecole HLA per poter essere presentate ai linfociti T in forma immunologicamente utile. Si tratta di un complesso di eventi non ancora del tutto elucidato, ma abbastanza conosciuto negli aspetti principali. Per le proteine catturate dall'esterno dalla cellula presentante la processazione avviene principalmente nei lisosomi e, solo per proteine che non necessitano di preliminare riduzione di ponti S=S per essere degradate, avviene negli endosomi a pH acido. Invece avviene nel citosol in un compartimento pre-Golgi per le proteine estranee sintetizzate dalla stessa cellula. Il primo atto sembrerebbe essere rappresentato in tutti e due i casi dall'intervento di molecole da stress o HSP che possono legarsi alle proteine favorendo l'intervento di enzimi proteolitici che le tagliano in peptidi dapprima di grosse dimensioni e successivamente di dimensioni sempre più piccole. L'insieme di questi enzimi costituisce un subset del pool cellulare dei proteosomi ed è in parte codificato da geni portati nella regione HLA di classe II in posizione centromerica rispetto ai loci DQ, e denominati LMP (o large multifunctional protease o anche low molecular mass polypeptide). Fra gli enzimi proteolitici coinvolti nella processazione degli antigeni, le thiol-proteasi e le aspartil-proteasi sembrano di particolare importanza, in quanto garantiscono un delicato equilibrio tra due sets di proteasi, quelle che distruggono e quelle che preservano determinati epitopi. Il complesso LMP consiste in una grande struttura proteolitica citoplasmatica contenente molti siti catalitici che la rendono capace di produrre molti peptidi contemporaneamente dallo stesso substrato. Tali siti sembrano essere localizzati nel complesso molecolare in modo da favorire la produzione preferenziale di peptidi di 9 aminoacidi. I peptidi così ottenuti derivati da proteine endogene sono consegnati a particolari proteine di trasporto denominate TAP (transporter of antigen peptide o transporter associated with antigen processing) codificate nella regione HLA nella subregione della classe II. Le TAP sono composte da due catene prodotte una dal gene TAP-1 e l'altra dal gene TAP-2. Esse sono situate nella membrana del reticolo-endoplasmico (RE) e sono responsabili del trasporto nel lume del RE dei peptidi prodotti nel citosol. I peptidi trasportati nel lume RE (come anche rari peptidi prodotti entro il RE con altri meccanismi) vengono quindi "consegnati" a molecole HLA di classe I, nelle quali inducono cambiamenti conformazionali che ne aumentano la termostabilità e che possono facilitarne lo spostamento verso la superficie cellulare. Invece le molecole HLA di classe II legano negli endosomi peptidi derivati da proteine esogene. Questa separazione non è tuttavia assoluta, come sarà precisato più avanti, e alcune proteine prodotte nel citosol possono essere presentate da

molecole HLA di classe II, mentre alcune altre proteine che entrano nella cellula APC per la via endocitica possono essere presentate da molecole HLA di classe I (Unanue 1992).

I lisosomi, nei quali avviene preferenzialmente la processazione enzimatica delle proteine esogene, non contengono molecole HLA di classe II. Queste sono presenti principalmente in particolari vescicole del compartimento endocitico che non hanno la morfologia tipica dei lisosomi, ma che contengono alcuni enzimi lisosomiali, come la β-esosaminidasi e la catepsina D, e il marker lisosomiale Lamp-1 o CD63, ma non molecole HLA di classe I. Queste vescicole sono probabilmente la sede del legame alle molecole HLA di classe II dei peptidi prodotti nei lisosomi. Come i peptidi lascino i lisosomi per incontrare le molecole HLA di classe II e fissarsi ad esse non è chiaro. Forse questo avviene tramite legame a proteine carriers, e più probabilmente a proteine HSP, come la PBP 72/74 identificata da Van Buskirk e coll. (1991). La consegna dei peptidi alle molecole HLA autologhe di classe I e di classe II è condizionata dal grado di affinità molecolare tra i peptidi e la tasca di presentazione delle molecole HLA. Esiste una competizione tra i peptidi per cui la tasca della molecola HLA sarà occupata da quelli con maggiore affinità. I peptidi che non saranno accolti dalle molecole HLA saranno sottoposti a ulteriore demolizione enzimatica fino ai singoli aminoacidi. L'ultima tappa di questo processo è rappresentata dal trasporto dei peptidi sulla membrana della cellula APC per la loro esposizione al riconoscimento da parte dei linfociti T specifici.

8. Le Proteine da Stress

Le proteine da stress, denominate HSP (heat shock proteins), sono fra le proteine più diffuse in natura, il cui coinvolgimento nei processi di difesa immunitaria è stato ben documentato negli ultimi anni. Questo è strettamente dipendente dalle proprietà biologiche di queste molecole, che sono principalmente:

1- l'attitudine a legarsi alle proteine, specie distese, e ai peptidi;

2- la loro induzione nelle cellule da parte di stress di varia natura, e la loro possibile espressione sulla superficie cellulare;

3- la loro immunogenicità.

8.1 Ruolo biologico delle HSP

Le HSP sono delle proteine prodotte dalle cellule in risposta a stimoli di vario tipo, tra i quali quello più comunemente usato in laboratorio è il calore. Sono estremamente diffuse in natura. Le HSP vengono suddivise in famiglie distinte in base al peso molecolare e alla funzione (v. tab. 4).

Famiglia	**Funzioni fisiologiche principali**	**Funzioni immunologiche principali**
Ubiquitina	Degradazione di proteine	Homing e traffico linfocitario; processazione peptidi antigenici; autoimmunità
HSP 60	Ripiegamento e dispiegamento di proteine; assemblaggio di complessi oligomerici	Antigene di molti patogeni; autoimmunità
HSP 70	Ripiegamento e dispiegamento di proteine, assemblaggio di complessi oligomerici	Antigene di molti patogeni; autoimmunità; assemblaggio delle Ig; trasporto peptidi
HSP 90	Prevenzione del legame del DNA al recettore di steroidi	Resistenza ai tumori; autoimmunità

Tabella 4. La superfamiglia HSP: ruolo fisiologico e relazione con la risposta immune delle principali HSP.

I membri di una data famiglia sono filogeneticamente molto conservati sia nella sequenza che nella funzione (Young 1990). Molte HSP svolgono funzioni importanti nella cellula normale dove sono costitutivamente presenti. I membri delle famiglie HSP70 e HSP60 hanno uno straordinario potere di legare i peptidi per cui interagiscono con molte proteine intracellulari. Deriva da questo il loro ruolo essenziale nel ripiegamento e dispiegamento, nell'assemblaggio e disassemblaggio, nel trasporto e nel rilascio di molte proteine, e il loro coinvolgimento nella presentazione dei peptidi antigenici (Kaufmann 1992). Molte proteine sono trasportate da un compartimento intracellulare all'altro in uno stato disteso (Rothmann e coll. 1986). Le HSP60 e 70 sono implicate nella distensione di proteine citoplasmatiche e nel loro successivo trasporto nei mitocondri, nei cloroplasti o nel reticolo endoplasmico. Una volta all'interno di questi compartimenti le HSP favoriscono il ripiegamento delle proteine e se è necessario il loro successivo assemblaggio in complessi oligomerici (Kaufmann e coll. 1990). I meccanismi che regolano l'espressione delle HSP, almeno per quanto riguarda le HSP70, sono probabilmente i seguenti: l'HSP libera interagisce con le proteine distese allo scopo di correggere tale conformazione. A temperatura elevata le HSP formeranno molti complessi con proteine distese, riducendo cosi direttamente il pool intracellulare di HSP libere. L'HSP libera interagisce con il fattore di trascrizione σ, e la riduzione di HSP libera, dovuta all'aumento di concentrazione delle proteine distese, fa aumentare la concentrazione di σ disponibile che induce la trascrizione di HSP (Kaufmann 1990; Craig e coll. 1991). Le HSP90 hanno un ruolo importante nel favorire l'azione degli steroidi. Esse impediscono infatti l'interazione tra il DNA e i recettori degli steroidi, legandosi a questi ultimi fino a quando vengono sostituite nel legame dall'ormone steroideo. Un'altra funzione importante di alcune HSP è quella di partecipare alla degradazione delle proteine distese. Questo ruolo è stato riconosciuto in particolare alla ubiquitina, una HSP di basso peso molecolare (Rothman e coll. 1986).

8.2 Ruolo immunologico delle HSP

Le proprietà dalle quali dipende in massima parte il ruolo che le HSP rivestono in immunologia sono rappresentate dalla capacità di interagire con le proteine e con i peptidi, e dall'immunogenicità. Le funzioni immunologiche principali riconosciute a queste proteine sono l'assemblaggio delle Ig, e delle molecole MHC, la processazione e il trasporto degli antigeni, la protezione delle cellule effettrici dai prodotti tossici self, il traffico e l'homing linfocitario (Kaufmann 1990).

8.2.1. Assemblaggio degli anticorpi

L'HSP 70 BIP (binding immunoglobulin protein) lega le catene pesanti Ig di nuova sintesi entro il reticolo endoplasmico prima del loro ripiegamento e della loro associazione con le catene leggere. In assenza di catene leggere la proteina BIP resta stabilmente legata alla catena pesante, trattenendola entro il lume del reticolo endoplasmico. Inoltre il BIP contribuisce direttamente all'assemblaggio delle Ig. Anche le catene α e β libere delle molecole HLA di classe II sono trattenute dall'HSP70 BIP nel RE fino al loro

assemblaggio (Neefjes e coll. 1992). Deve essere ricordato che l'HSP70 è codificata in 3 loci del MHC nella regione della classe III, denominati HSP70-2, HSP70-1 e HSP70-HOM.

8.2.2. Processazione e trasporto degli antigeni

Gli antigeni T-dipendenti sono processati dalle cellule APC in peptidi e riconosciuti dai TCR dei linfociti T nel contesto delle molecole HLA. La processazione delle proteine antigeniche avviene in diverse tappe che comprendono: la distensione delle proteine, la loro degradazione enzimatica, l'associazione delle HSP con i peptidi risultanti e la successiva presentazione di questi da parte delle molecole MHC. Le molecole HSP agiscono in tre punti di questo processo: nella distensione delle proteine, nella degradazione (ruolo svolto essenzialmente dalla ubiquitina) e nel legame e trasporto dei peptidi, dopo la processazione ma prima della cattura di questi nel compartimento endosomiale. Alcune ricerche attribuiscono alle HSP un ruolo anche nell'associazione tra la catena pesante delle molecole MHC di classe I e la β2-microglobulina. Queste tappe sono state in parte dimostrate con una HSP70 in linfociti B e in macrofagi (De Nagel e coll. 1991).

8.2.3. Protezione delle cellule effettrici

L'attività citolitica nei confronti delle cellule bersaglio può essere espletata dai linfociti $CD8^+$ con specificità per l'antigene e in restrizione HLA di classe I, e dai linfociti LGL in modo non specifico e senza restrizione HLA. E' stato osservato che se le cellule bersaglio sono preliminarmente sottoposte a shock diventano più resistenti nei confronti dell'azione litica sia dei linfociti T che NK. Questo effetto protettivo è stato attribuito alle HSP prodotte dalle cellule bersaglio in seguito allo shock. E' stato dimostrato che le HSP possono aumentare la resistenza delle cellule anche alla lisi da TNF (Golstein e coll. 1991).

I macrofagi e i granulociti neutrofili esercitano la loro difesa antimicrobica producendo dei metaboliti tossici capaci di uccidere i microrganismi fagocitati. Senza un adeguato meccanismo di protezione tali metaboliti sarebbero nocivi per le stesse cellule che li producono. Si ritiene che le HSP, prodotte in grandi quantità in presenza dei metaboliti tossici, svolgano questo ruolo protettivo.

8.2.4. Homing e traffico linfocitario

Un recettore linfocitario implicato nelle interazioni adesive con le HEV, che ha un ruolo essenziale nel traffico e nel homing dei linfociti, è il MEL-14 (v. capitolo 6). E' stato dimostrato che l'ubiquitina è un componente di questo recettore. Sembra pertanto che l'ubiquitina sia coinvolta nella funzione del MEL-14 (Kaufmann 1990).

8.2.5. Immunogenicità

Le HSP prodotte da microrganismi, da cellule normali o variamente alterate e da cellule neoplastiche, sono in grado di scatenare una reazione immunitaria in quanto dotate di immunogenicità. Nel caso di microrganismi le HSP, soprattutto delle famiglie 60 e 70, sono prodotte in grande quantità in risposta all'attacco del sistema immunitario dell'ospite. Esse, pur avendo alti livelli di omologia tra loro, sono: differenziate per tipo di microrganismo, stabili e antigenicamente dominanti. E' stata dimostrata in diversi casi di infezione la produzione sia di anticorpi che di cloni T specifici contro tali proteine, le quali possono rappresentare degli utili markers diagnostici. Non è stato però ancora stabilito se questo tipo di risposta immunitaria è efficace contro i microrganismi che hanno prodotto le HSP (Kaufmann 1990).

Cellule normali, ma soprattutto cellule alterate per stress di vario tipo come infiammazioni, traumi, infezioni, etc., possono produrre delle HSP (specialmente HSP60 e 70) capaci di attivare una reazione T linfocitaria specifica. Le HSP contribuiscono così alla eliminazione di tali cellule.

Con meccanismo simile le HSP potrebbero avere un ruolo nella sorveglianza nei confronti di cellule tumorali. Ciò è suggerito da indagini sul topo che hanno dimostrato la capacità di tumori indotti chimicamente di produrre HSP100/90. Queste possono causare una immunizzazione contro il tumore dal quale derivano ma non contro altri tumori. Sembra probabile che in questo caso le HSP fungano da carriers di piccoli antigeni tumorali responsabili dell'immunità specifica. Questa ipotesi si accorda con l'attività fisiologica di molecole di trasporto di peptidi di molte HSP, e con il coinvolgimento già ricordato di queste nella presentazione dei peptidi endogeni anche tumorali da parte delle molecole MHC.

In alcune condizioni, linfociti T specifici per HSP60 e 70 sembrano poter causare sequele patologiche di infezioni croniche e contribuire cosi a malattie autoimmuni (Kaufmann 1990). Prove di ciò sono state portate in studi sperimentali sull'animale: nel ratto, mediante induzione di artrite reumatoide, attraverso immunizzazione con adiuvante di Freund contenente micobatteri, e nel topo spontaneamente affetto da una forma di diabete simile al diabete-insulino-dipendente umano. Nel primo caso si sviluppavano dei T linfociti attivi contro una HSP60 endogena presente nei tessuti articolari, e nel secondo caso erano dimostrabili T linfociti specifici contro una HSP60 endogena cross-reattiva con HSP60 umana secondo alcuni coinvolte nell'IDDM. In alcune malattie autoimmuni umane sono stati osservati anticorpi anti-HSP, in particolare, anti-HSP65 nell'artrite reumatoide, anti HSP90 nella spondilite anchilosante e anti-HSP70, anti-HSP90 e anti-ubiquitina nel LES. Il loro significato patogenetico non è chiaro. I linfociti T responsabili dell'attività anti-HSP possono essere di tipo $\alpha\beta$ ma più spesso di tipo $\gamma\delta$, specialmente nel caso dell'artrite reumatoide e delle infezioni da micobatteri. Tuttavia per quanto riguarda l'uomo non disponiamo ancora di dati certi che i linfociti T$\gamma\delta$ abbiano in questi casi un ruolo importante.

9. Il Sistema MHC

Una descrizione dettagliata del sistema MHC dell'uomo, o HLA, esula dai propositi di questo lavoro per cui si rimanda a opere specificamente dedicate ad esso (Dausset e coll. 1989). Qui ci limiteremo a dare gli elementi essenziali alla comprensione del ruolo immunologico delle molecole HLA.

Queste sono le molecole presentatrici dei peptidi ai TCRαβ dei linfociti T helper-inducer ($CD4^+$) e T citotossici-soppressori ($CD8^+$) e hanno un ruolo essenziale nel riconoscimento da parte dei linfociti T che, come più volte ricordato, riguarda contestualmente l'antigene e la molecola HLA self presentatrice. Questo riconoscimento è alla base dell'ontogenesi dei T linfociti, della costruzione del repertorio T linfocitario individuale, e della esecuzione della risposta immunitaria T linfocitaria e B linfocitaria T-dipendente.

9.1. I geni HLA

Sono codificati, insieme alle molecole HLA di classe III, in una regione cromosomica di 3500 kb del braccio corto del 6° cromosoma. L'organizzazione genica di tale regione (regione HLA) è schematizzata nella figura 11.

La regione HLA è suddivisa in tre sub-regioni nelle quali sono codificate le molecole HLA di classe I, di classe II e di classe III. A partire dal centromero in direzione telomerica si susseguono:

a) la regione di classe II, di circa 1000 kb, organizzata in 16 loci, 9 dei quali codificanti per molecole HLA. Essi sono nell'ordine: i loci DPB1 e DPA1, codificanti per le molecole DP; i loci DQB1 e DQA1, codificanti per le molecole DQ; i loci DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5 che insieme al locus DRA codificano rispettivamente per le molecole DR1-DR18, DRw52a, b, e c, DRw53, e DR51. Le molecole HLA di classe II sono composte da dimeri $DP\alpha / DP^b$, $DQ\alpha / DQ\beta$ e DR^a / DR^b . I singoli alleli e le corrispondenti specificità sono riportati nelle tab. 7 e 8.

Nella stessa regione sono localizzati numerosi altri loci non HLA, riportati nella fig. 11, tra i quali sono compresi quelli che codificano per le proteine di trasporto dei peptidi all'interno del reticolo endoplasmico (TAP-1 e 2) e per quelle coinvolte nella processazione degli antigeni (LMP-2 e 7). I prodotti dei geni TAP-1 e TAP-2 si associano in una molecola eterodimerica. Sia i geni LMP che TAP sono polimorfici, ma non sappiamo se questo si traduce in differenze funzionali. Sembra possibile che a differenti prodotti LMP e TAP corrispondano differenti peptidi prodotti dallo stesso antigene in differenti individui.

b) la regione di classe III, di 1000 kb, che contiene almeno 25 loci, di cui 9 codificano rispettivamente per l'enzima 21-OH idrossilasi (gene CYP21B), per i fattori del complemento C4 (C4B e C4A), Bf (gene BF) e C2 (gene C2), per le proteine da stress HSP70 (geni HSPA1 e A2) e per il Tumor Necrosis Factor (geni TNF-A e TNF-B). Le singole specificità sono riportate nella tab. 6.

c) la regione di classe I, di circa 1500 kb con almeno 10 loci, codificanti ciascuno per una distinta catena α (catena pesante), capace di associarsi in eterodimero con la β2-

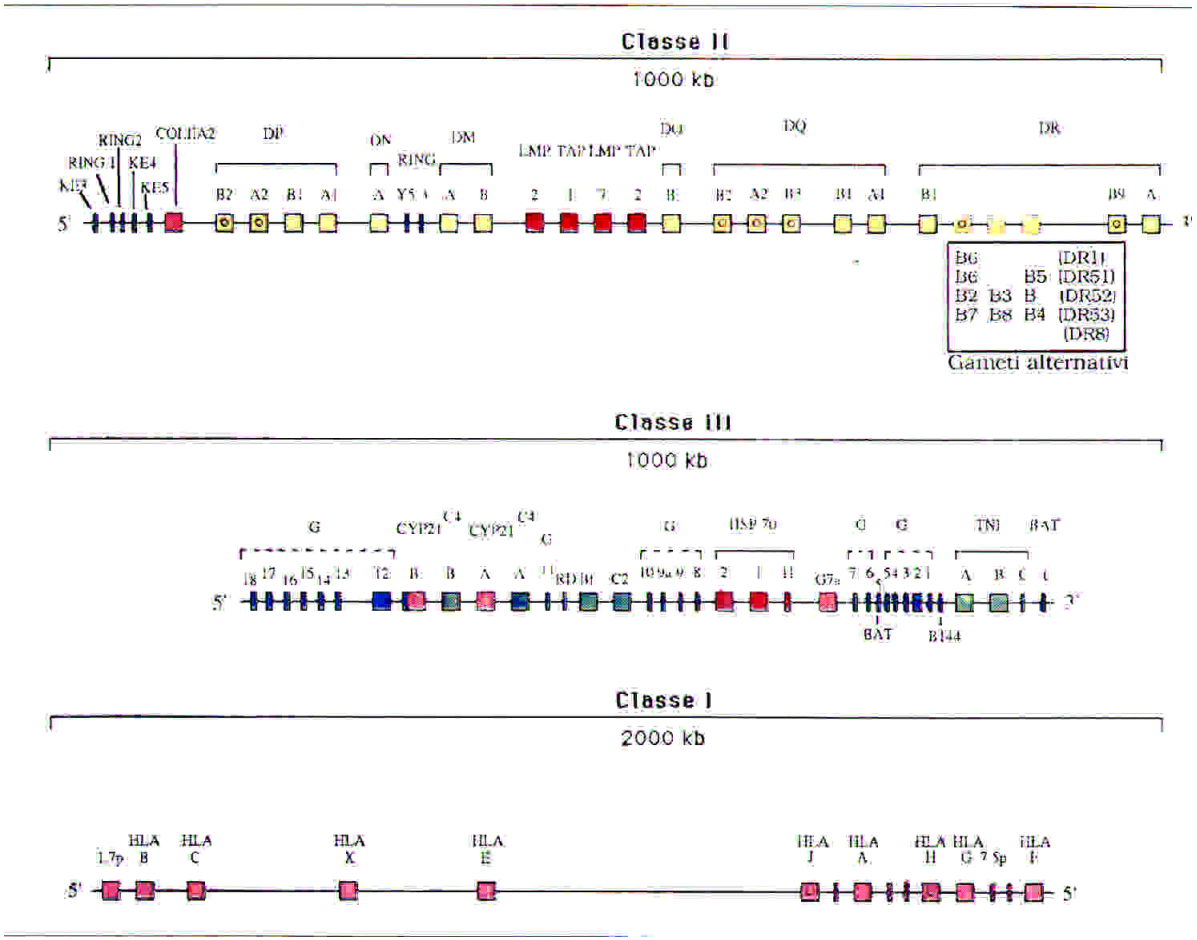


Figura 11. Organizzazione genica della regione HLA. I geni codificanti per i prodotti di classe I, di classe II e di classe III sono rappresentati da riquadri rispettivamente rosa, gialli e verdi. I riquadri azzurri indicano geni di funzione non conosciuta. In marrone sono indicati dei geni non HLA codificanti per funzioni enzimatiche. In violetto sono rappresentati i geni codificanti per proteine di processazione e di trasporto (LMP, TAP e HSP) dei peptidi. Gli pseudogeni sono indicati da cerchietti all'interno dei riquadri. I riquadri punteggiati nella subregione DR rappresentano loci che possono mancare in alcuni gameti. Le distanze tra i geni sono solamente indicative e non corrispondono alle distanze reali.

SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	ALLELI	SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	ALLELI	SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	ALLELI
A1	A*0101	Cw1	Cw*0101	B7	B*0701
A2	A*0201	Cw1	Cw*0102	B7	B*0702
A2	A*0202	Cw2	Cw*0201	B703	B*0703
A203	A*0203	Cw2	Cw*02021	B8	B*0801
A2	A*0204	Cw2	Cw*02022	B13	B*1301
A2	A*0205	Cw3	Cw*0301	B13	B*1302
A2	A*0206	Cw3	Cw*0302	B14	B*1401
A2	A*0207	Cw4	Cw*0401	B65 (14)	B*1402
A2	A*0208	Cw5	Cw*0501	B62 (15)	B*1501
A2	A*0209	Cw6	Cw*0601	B75 (15)	B*1502
A210	A*0210	Cw7	Cw*0701	B72 (70)	B*1503
A2	A*0211	Cw7	Cw*0702	B62 (15)	B*1504
A2	A*0212	Cw8	Cw*0801	B18	B*1801
A3	A*0301	Cw8	Cw*0802	B27	B*2701
A3	A*0302	-	Cw*1201	B27	B*2702
A11	A*1101	-	Cw*1202	B27	B*2703
A11	A*1102	-	Cw*1301	B27	B*2704
A23 (9)	A*2301	-	Cw*1401	B27	B*2705
A24 (9)	A*2401			B27	B*2706
A24 (9)	A*2402			B27	B*2707
A2403	A*2403			B35	B*3501
A25 (10)	A*2501			B35	B*3502
A26 (10)	A*2601			B35	B*3503
A29 (19)	A*2901			B35	B*3504
A29 (19)	A*2902			B35	B*3505
A30 (19)	A*3001			B35	B*3506
A30 (19)	A*3002			B37	B*3701
A31 (19)	A*31011			B38 (16)	B*3801
A31 (19)	A*31012			B3901	B*3901
A32 (19)	A*3201			B3902	B*3902
A33 (19)	A*3301			B60 (40)	B*4001
A34 (10)	A*3401			B40	B*4002
A34 (10)	A*3402			B40	B*4003
A36	A*3601			B40	B*4004
A43	A*4301			B4005	B*4005
A66 (10)	A*6601			B41	B*4101
A66 (10)	A*6602			B42	B*4201
A68 (28)	A*6801			B44 (12)	B*4401
A68 (28)	A*6802			B44 (12)	B*4402
A69 (28)	A*6901			B44 (12)	B*4403
A74 (19)	A*7401			B45 (12)	B*4501
				B46	B*4601
				B47	B*4701
				B48	B*4801
				B49 (21)	B*4901
				B50 (21)	B*5001
				B51 (5)	B*5101
				B5102	B*5102
				B5103	B*5103
				B52 (5)	B*5201
				B53	B*5301
				B54 (22)	B*5401
				B55 (22)	B*5501
				B55 (22)	B*5502
				B56 (22)	B*5601
				B56 (22)	B*5602
				B57 (17)	B*5701
				B57 (17)	B*5702
				B58 (17)	B*5801
				B7801	B*7801
				-	B*7901

Tabella 5. Specificità ed alleli HLA-A, C e B riconosciuti al 1991.

C2	Bf	C4A	C4B
C2 1	Bf S	C4A Q0	C4B Q0
C2 2	Bf S0.7	C4A 8	C4B 6
C2 3	Bf F	C4A 7	C4B 5
C2 Var.	Bf F1	C4A 6	C4B 45
	Bf Var.	C4A 58	C4B 4
		C4A 55	C4B 35
		C4A 5	C4B 3
		C4A 45	C4B 22
		C4A 4	C4B 2
		C4A 3	C4B 13
		C4A 2	C4B 12
		C4A 12	C4B 11
		C4A 1	C4B 1
		C4A 91	C4B 92
			C4B 94
			C4B 95
			C4B 96

Tabella 6. Principali specificità HLA di classe III.

microglobulina (catena leggera) per formare una molecola HLA di classe I. I loci B, C ed A codificano nell'ordine per le catene α delle molecole HLA-B, Cw ed A. Le singole specificità sono riportate nella tabella 5.

Ogni individuo possiede due gameti HLA, uno di origine paterna e l'altro di origine materna. Ciascun gamete porta una serie completa dei geni HLA di I, II, III classe per cui un individuo ha due geni HLA in ciascun locus, e in ciascuno dei loci può essere omozigote (i due alleli sono identici) o eterozigote (i due alleli sono differenti). L'insieme degli alleli HLA portati in un gamete è detto aplotipo e viene trasmesso in blocco ai figli, salvo crossing-over.

9.2. Le molecole HLA

Le molecole HLA sono delle glicoproteine dimeriche strutturate in due tipi differenti, che sono stati denominati antigeni di classe I e antigeni di classe II.

Gli antigeni di classe I (HLA-A, B e Cw) sono composti da una catena polipeptidica di 44 kD (catena α o pesante) associata con legami non covalenti a una catena leggera di 12 kD rappresentata dalla β2-microglobulina. La catena α è codificata nel braccio corto del cromosoma 6 nei loci A, B e C, mentre la β2-microglobulina è codificata nel cromosoma 15. La prima è altamente polimorfica ed è responsabile delle numerose varietà fenotipiche della molecola e delle sue funzioni specifiche, mentre la seconda è monomorfica ed ha essenzialmente una funzione di sostegno e di stabilizzazione della molecola sulla membrana. La catena α costituita da 342 aminoacidi è suddivisa in tre regioni: una regione extracellulare esposta sulla membrana della cellula, una regione transmembrana e una regione intracitoplasmatica con l'estremità terminale carbossilica (v. fig. 12 a).

La regione extracellulare è strutturata in 3 dominî denominati dall'esterno verso

SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	SPECIFICITA' HLA-D	ALLELI
-	-	DRA*0101
-	-	DRA*0102
DR1	Dw1	DRB1*0101
DR1	Dw20	DRB1*0102
DR103	Dw'Bon'	DRB1*0103
DR15 (2)	Dw2	DRB1*1501
DR15 (2)	Dw12	DRB1*1502
DR15 (2)	-	DRB1*1503
DR16 (2)	Dw21	DRB1*1601
DR16 (2)	Dw22	DRB1*1602
DR17 (3)	Dw3	DRB1*0301
DR18 (3)	Dw'RSH'	DRB1*0302
DR18 (3)	-	DRB1*0303
DR4	Dw4	DRB1*0401
DR4	Dw10	DRB1*0402
DR4	Dw13	DRB1*0403
DR4	Dw14	DRB1*0404
DR4	Dw15	DRB1*0405
DR4	Dw'KT2'	DRB1*0406
DR4	Dw13	DRB1*0407
DR4	Dw14	DRB1*0408
DR4	-	DRB1*0409
DR4	-	DRB1*0410
DR4	-	DRB1*0411
DR4	-	DRB1*0412
DR11 (5)	Dw5	DRB1*11011
DR11 (5)	Dw5	DRB1*11012
DR11 (5)	Dw'JVM'	DRB1*1102
DR11 (5)	-	DRB1*1103
DR11 (5)	Dw'FS'	DRB1*11041
DR11 (5)	-	DRB1*11042
DR11 (5)	-	DRB1*1105
DR12 (5)	Dw'DB6'	DRB1*1201
DR12 (5)	-	DRB1*1202
DR13 (6)	Dw18	DRB1*1301
DR13 (6)	Dw19	DRB1*1302
DR13 (6)	Dw'HAG'	DRB1*1303
DR13 (6)	-	DRB1*1304
DR13 (6)	-	DRB1*1305
DR13 (6)	-	DRB1*1306
DR14 (6)	Dw9	DRB1*1401
DR14 (6)	Dw16	DRB1*1402
DR1403	-	DRB1*1403
DR1404	-	DRB1*1404
DR14 (6)	-	DRB1*1405
DR14 (6)	-	DRB1*1406
	DR14 (6)	-
DRB1*1407		
DR14 (6)	-	DRB1*1408
DR14 (6)	-	DRB1*1409
-	-	DRB1*1410
DR7	Dw17	DRB1*0701
DR7	Dw'DB1'	DRB1*0702
DR8	Dw8.1	DRB1*0801
DR8	Dw8.2	DRB1*08021
DR8	Dw8.2	DRB1*08022
DR8	Dw8.3	DRB1*08031
DR8	Dw8.3	DRB1*08032
DR8	-	DRB1*0804
DR8	-	DRB1*0805
DR9	Dw23	DRB1*09011
DR9	Dw23	DRB1*09012
DR10	-	DRB1*1001
DR52	DW24	DRB3*0101
DR52	DW25	DRB3*0201
DR52	DW25	DRB3*0202
DR52	DW26	DRB3*0301
DR53	Dw4, Dw10, Dw13, Dw14, Dw15, Dw17, Dw23	DRB4*0101
DR51	Dw2	DRB5*0101
DR51	Dw12	DRB5*0102
DR51	Dw21	DRB5*0201
DR51	Dw22	DRB5*0202

Tabella 7. Specificità DR, Dw e alleli corrispondenti nei loci DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5.

HLA-DQB

SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	SPECIFICITA' HLA-D	ALLELI
DQ5 (1)	Dw1	DQB1*0501
DQ5 (1)	Dw21	DQB1*0502
DQ5 (1)	Dw9	DQB1*05031
DQ5 (1)	Dw9	DQB1*05032
-	-	DQB1*0504
DQ6 (1)	Dw12, w8	DQB1*0601
DQ6 (1)	Dw2	DQB1*0602
DQ6 (1)	Dw18, Dw'FS'	DQB1*0603
DQ6 (1)	Dw19	DQB1*0604
DQ6 (1)	Dw19	DQB1*0605
-	-	DQB1*0606
DQ2	Dw3, w7	DQB1*0201
DQ7 (3)	Dw4, w5, w8, w13	DQB1*0301
DQ8 (3)	Dw4, w10, w13, w14	DQB1*0302
DQ9 (3)	Dw23	DQB1*03031
DQ9 (3)	Dw23, w11	DQB1*03032
DQ7 (3)	-	DQB1*0304
DQ4	Dw15	DQB1*0401
DQ4	Dw8, Dw'RSH'	DQB1*0402

HLA-DQA

SPECIFICITA' SIEROLOGICHE	SPECIFICITA' HLA-D	ALLELI
(*)	Dw1, w9	DQA1*0101
	Dw2, w21, w19	DQA1*0102
	Dw18, w12, w8, Dw'FS'	DQA1*0103
	-	DQA1*0104
	Dw7, w11	DQA1*0201
	Dw4, w10, w13, w14, w15	DQA1*03011
	Dw23	DQA1*03012
	Dw23	DQA1*0302
	Dw8, Dw'RSH'	DQA1*0401
	Dw3, w5, w22	DQA1*0501
	Dw3	DQA1*05011
	Dw5	DQA1*05012
	D22	DQA1*05013
	Dw8	DQA1*0601

(*) Non esistono finora sieri che riconoscano delle specificità DQA

Tabella 8a. Specificità DQ e Dw ed alleli DQA, e DQB corrispondenti.

HLA-DP

SPECIFICITA' HLA-DP	ALLELI DPB1	SPECIFICITA' HLA-DP	ALLELI DPA1
DPw1	DPB1*0101	-	DPA1*0101
DPw2	DPB1*0201	-	DPA1*0102
DPw2	DPB1*02011	-	DPA1*0103
DPw2	DPB1*02012	-	DPA1*0201
DPw2	DPB1*0202	-	DPA1*02021
DPw3	DPB1*0301	-	DPA1*02022
DPw4	DPB1*0401	-	DPA1*0301
DPw4	DPB1*0402	-	DPA1*0401
DPw5	DPB1*0501		
DPw6	DPB1*0601		
-	DPB1*0801		
-	DPB1*0901		
-	DPB1*1001		
-	DPB1*1101		
-	DPB1*1301		
-	DPB1*1401		
-	DPB1*1501		
-	DPB1*1601		
-	DPB1*1701		
-	DPB1*1801		
-	DPB1*1901		
-	DPB1*2001		
-	DPB1*2101		
-	DPB1*2201		
-	DPB1*2301		
-	DPB1*2401		
-	DPB1*2501		
-	DPB1*2601		
-	DPB1*2701		
-	DPB1*2801		
-	DPB1*2901		
-	DPB1*3001		
-	DPB1*3101		
-	DPB1*3201		
-	DPB1*3301		
-	DPB1*3401		
-	DPB1*3501		
-	DPB1*3601		

Tabella 8b. Specificità DPw ed alleli DPA e DPB.

l'interno α1, α2, α3. I dominî α1, e α2 portano le specificità antigeniche allelomorfiche HLA-A, B e Cw, definite da alloantisieri specifici. Finora sono state identificate serologicamente 27 specificità HLA-A, 59 specificità B e 10 specificità Cw (v. tabella n. 5). Fra i dominî α1 e α2 è delimitata una cavità (tasca dei peptidi) in cui sono portati e presentati al recettore TCRαβ dei linfociti T gli antigeni processati in forma di peptidi (Bjorkman e coll. 1987). Il dominio α1 è legato in modo non covalente con la β2-m, mentre il dominio α3 si continua nel segmento transmembrana e quindi nel segmento intracitoplasmatico che ha funzioni di trasduttore di segnali all'interno della cellula. Tra i dominî α1 e α2 8 foglietti β ripiegati anti-paralleli formano un pavimento che insieme alle due α-eliche (una per ciascun dominio) disposte ai lati delimitano una cavità di circa 25 Å di lunghezza x 10 Å di larghezza x 11 Å di profondità, nella quale sono accolti gli antigeni processati. Il peptide antigenico contenuto nella cavità può essere composto di 8 aminoacidi se disteso, fino a 25 aminoacidi se completamente strutturato ad α-elica (v. fig. 13).

Dati recenti presentati all'11° Workshop Internazionale dell'Istocompatibilità sembrano dimostrare che generalmente i peptidi accolti nella tasca apposita sono composti da 8-10 aa. alcuni dei quali, critici per il legame con la molecola HLA, occupano posizioni obbligate nella sequenza e sono sempre identici o poco variabili nei diversi peptidi. La risoluzione a 2.6 Å nell'analisi dei cristalli della molecola HLA-A ha dimostrato che la cavità dei peptidi è strutturata in 6 recessi che sono stati denominati A, B, C, D, E, F, dove trovano alloggiamento i peptidi sia nella loro catena principale che nelle catene laterali. Alcuni recessi della cavità sembrano accogliere particolari residui aa. dei peptidi. Così i recessi A ed F accolgono rispettivamente gli estremi amino- e carbossi-terminali dei peptidi estesi, i residui laterali isoleucina e leucina si collocano nel recesso B della molecola HLA-A2, mentre il residuo arginina si colloca nel recesso B della molecola HLA-B27. Ognuna delle differenti specificità HLA di classe I ha una differente tasca dei peptidi e un determinato peptide sarà ancorato in ciascuna di esse in modo diverso, e quindi potrà esporre ai TCRαβ epitopi diversi.

La fissazione del peptide nella tasca apposita non è specifica e sembra assicurata da alcuni residui aminoacidici in grado di formare legami idrogeno con corrispondenti residui aa. della tasca. L'insieme degli aa. che compongono la tasca dei peptidi differisce in modo più o meno rilevante nelle diverse molecole HLA specialmente in alcune regioni dette "ipervariabili". Per questo l'affinità di una molecola HLA per i peptidi può essere molto diversa da un peptide all'altro, e nei confronti dello stesso peptide molecole HLA differenti hanno differente affinità.

Questo si traduce in una differente probabilità di essere presentati da parte di una molecola HLA per i peptidi prodotti dalla processazione di una data proteina. In effetti per ciascuna molecola HLA si instaura una competizione tra peptidi a tutto vantaggio di quelli con maggiore affinità, che avranno quindi la maggiore probabilità di essere presentati ai linfociti T e di indurre una risposta immunitaria. E' stato dimostrato che peptidi di $9^{\pm}1$ aa. si legano a molecole di classe I con affinità 100-1000 volte maggiore di peptidi più lunghi o più corti, e che quando sono presenti, anche come contaminanti, in preparazioni di peptidi più lunghi, i peptidi nonamerici si legheranno alle molecole di classe I preferenzialmente (Benjamin e coll. 1991).

Una molecola HLA può fissare e presentare una grande varietà di peptidi, ma

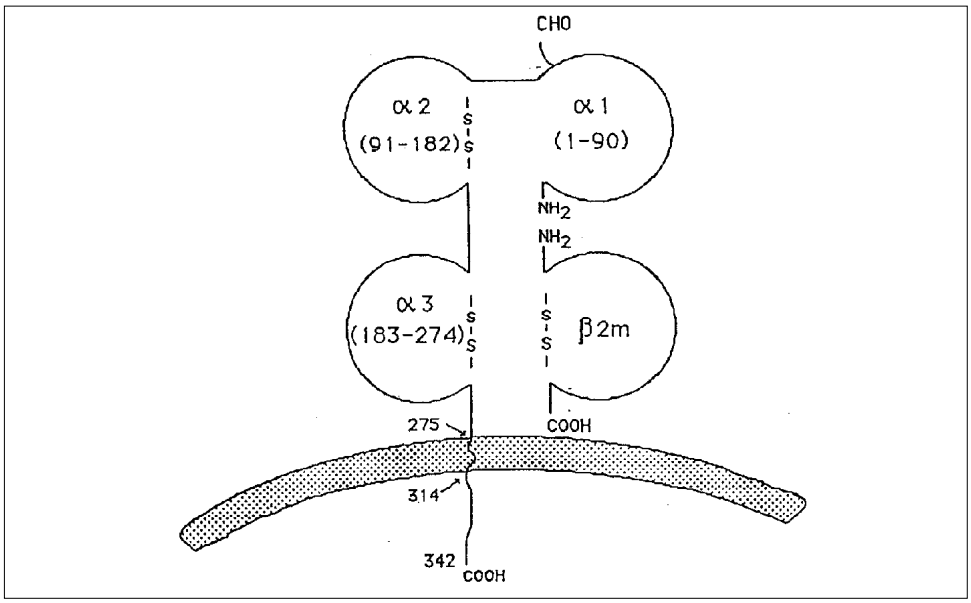


Figura 12 a. Rappresentazione schematica di una molecola HLA di classe I. Questa è composta da una catena pesante α, strutturata in 5 domini (α1, α2, α3, transmembrana e intracitoplasmatico) e da una catena leggera (β2-m), associata alla prima a livello del dominio α1 con legame non covalente.

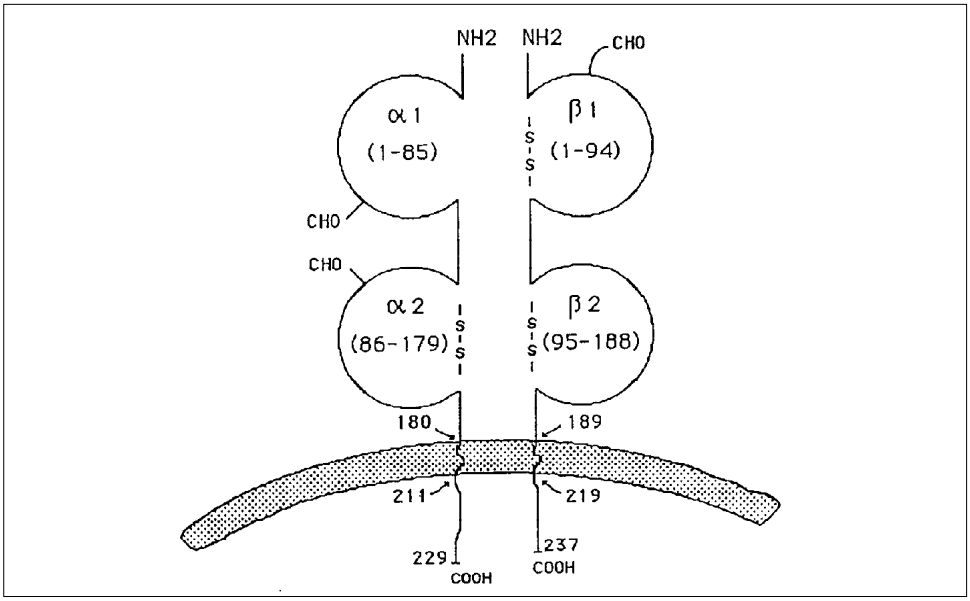


Figura 12 b. Rappresentazione schematica di una molecola HLA di classe II (DR). Questa è composta da una catena pesante α e da una catena leggera β, associate tra loro in modo non covalente. Entrambe le catene sono composte da 4 domini, 2 esterni α1, α2 e β1, β2 rispettivamente, uno transmembrana e uno intracitoplasmatico.

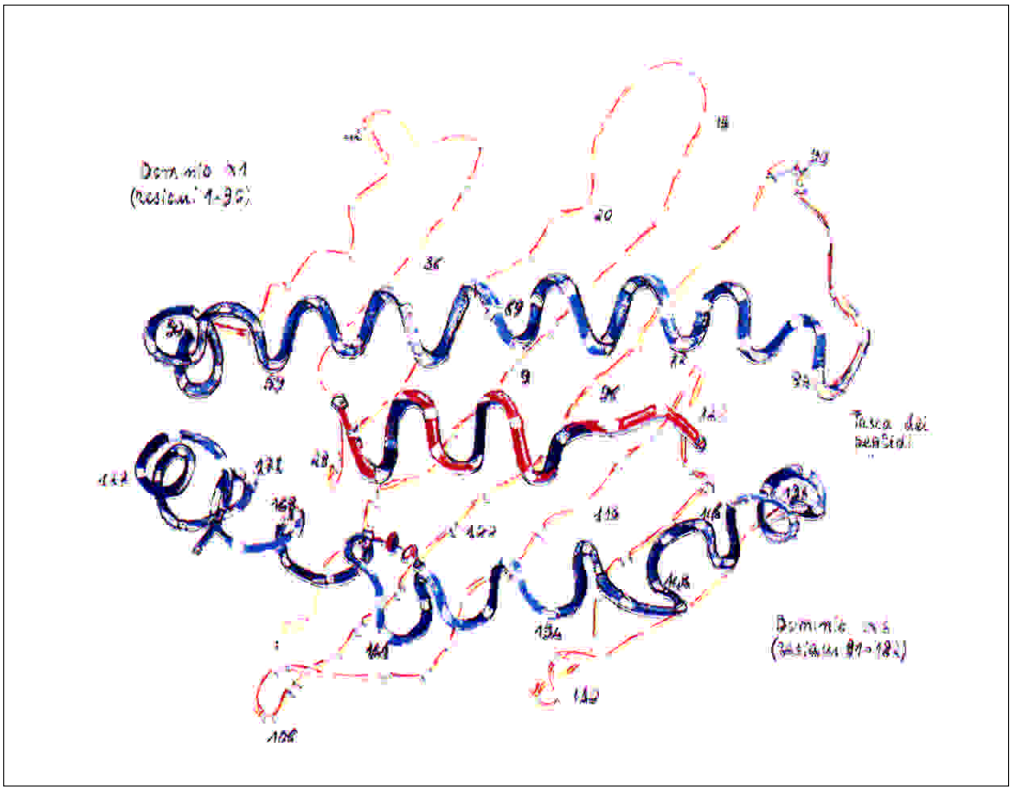


Figura 13. Raffigurazione della cavità dei peptidi di una molecola HLA di classe I contenente un peptide di 14 aa. ripiegato in parte ad α-elica (al centro in rosso).

Da Contu e coll. Immunogenetica: aspetti clinici e popolazionistici. Il sistema HLA: concetti generali. Ann. It. Med. Int., 5: 360-404, 1990.

solamente uno per volta. Sembra logico supporre che più molecole HLA differenti possano presentare al riconoscimento T linfocitario una maggiore varietà di peptidi e di epitopi, rispetto a un solo tipo di molecola HLA, realizzando così una più valida difesa immune. In questo senso gli individui eterozigoti per tutti e tre i loci HLA di classe I, disponendo di 6 differenti molecole (2A, 2B e 2Cw) avrebbero un netto vantaggio immunologico rispetto agli individui completamente omozigoti che dispongono di tre soli tipi di molecola HLA. Ovviamente lo stesso ragionamento si applica alle molecole HLA di classe II.

Queste molecole, rappresentate dagli antigeni DR, DQ e DP, complessivamente denominati anche Ia, sono composte da due catene glicoproteiche, una pesante, di circa 34 kD (catena α) e una leggera di circa 29 kD (catena β) associate tra loro da legami non covalenti. Nel reticolo-endoplasmico le due catene α e β, prima del loro ancoraggio alla membrana cellulare, sono associate con legami non covalenti a una terza catena denominata catena γ o invariante (Ii), codificata nel cromosoma 5 e costituita da un

peptide di 10-15 aa. Il complesso molecolare HLA αβ+γ è trasferito dall'apparato di Golgi in un endosoma acidico dove dopo aver perso la catena γ può captare un peptide esogeno o un peptide self (raramente un peptide endogeno) e trasportarlo sulla membrana per la presentazione ai linfociti T $CD4^+$. La funzione della catena γ non è ancora ben stabilita. Si tratta di una proteina transmembrana di tipo II (cioè l'aminoterminale è intracellulare). Potrebbe fungere da struttura di connessione tra le catene HLA α e β fino all'inserimento nella tasca apposita del peptide (che dà stabilità alla molecola), oppure da guida della molecola HLA nell'endosoma, o ancora potrebbe servire per impedire che nel reticolo-endoplasmico peptidi endogeni si fissino a molecole HLA di II classe (v. più avanti). La catena γ è espressa sulla superficie cellulare dove è identificata come antigene CD74. Entrambe le catene α e β sono codificate da loci portati sul braccio corto del 6° cromosoma e sono strutturate in 3 segmenti o regioni: una regione extracellulare, una regione transmembrana e una regione intracellulare (v. fig. 12 b). Gli ultimi due segmenti ancorano la molecola alla membrana cellulare. I segmenti extracellulari delle catene α e β contengono due dominî ciascuno, uno distale (α1 e β1) e l'altro prossimale (α2 e β2). Il dominio β1 è quello più variabile e maggiormente responsabile delle diverse specificità fenotipiche delle molecole di classe II. Tra i dominî α1 e β1 , in un modo analogo a quello visto per le molecole di classe I tra i dominî α1 e α2, è delimitata una cavità per la presentazione dei peptidi antigenici processati. Tra le due cavità sembrano esserci tuttavia importanti differenze.

La tasca dei peptidi delle molecole di classe I è chiusa ai due estremi e questo impone probabilmente per i peptidi che devono essere accolti una lunghezza di 8-10 aa. La tasca dei peptidi delle molecole di classe II può essere invece aperta a un estremo, e questo permette di accogliere peptidi un po' più grandi (circa 14 aa.). Una sequenza di 4 aminoacidi esposta all'esterno sul dominio β2 è il sito al quale si lega la molecola CD4 delle cellule T helper-inducer durante il riconoscimento del peptide e della molecola HLA di classe II da parte del TCR2. Gli antigeni HLA di classe I non hanno tale sequenza e non sono coinvolti nel riconoscimento da parte dei linfociti T helper-inducer. Essi sono invece riconosciuti, contestualmente al peptide presentato, dai linfociti T citotossici-soppressori che sono CD8 positivi. Sappiamo che le molecole di classe I presentano principalmente peptidi endogeni, e le molecole di classe II peptidi esogeni.

Finora sono state identificate serologicamente 24 differenti specificità DR, 9 specificità DQ e 6 specificità DP (v. tabelle n. 7 e 8). A livello molecolare sono stati identificati 2 alleli DRA, 60 DRB1, 4 DRB3, 1 DRB4, 4 DRB5, 3 DRB6, 14 DQA, 19 DQB, 8 DPA e 38 DPB. Gli antigeni HLA di classe I sono praticamente ubiquitari e sono dimostrabili in quasi tutte le cellule dell'organismo, e in particolare nei linfociti sia T che B e nei monociti e macrofagi. Gli antigeni HLA di classe II sono invece normalmente presenti nei linfociti B, in una parte dei monociti , nei macrofagi, nelle cellule di Langerhans, nelle cellule epiteliali timiche e nei linfociti T attivati.

9.3. Ruolo delle molecole HLA

Le molecole HLA svolgono due funzioni di notevole importanza agli effetti della difesa immunologica. La prima è quella di molecola di presentazione dei peptidi antigenici di cui si è già parlato. Deve essere precisato che le molecole HLA di classe I presentano peptidi endogeni e in particolare peptidi di proteine estranee sintetizzate "endogenamente" nelle cellule APC (per esempio peptidi di proteine virali e di antigeni tumorali), mentre le molecole HLA di classe II presentano peptidi esogeni derivati da processazione di proteine estranee captate dalle cellule APC dall'ambiente extracellulare e internalizzate. I peptidi endogeni prodotti nel citosol entrano nel ciclo secretorio della cellula in un compartimento pre-Golgi, cioè nel reticolo-endoplasmico dove, via via che sono sintetizzate, vengono inserite le molecole HLA sia di classe I che di classe II, mentre i peptidi esogeni sono prodotti negli endosomi per processazione di proteine internalizzate. Nel reticolo-endoplasmico solamente le molecole di classe I sono in grado di captare i peptidi endogeni in quanto nelle molecole di classe II ciò è impedito dal legame della catena invariante Ii. Così dal reticolo-endoplasmico fuoriescono molecole di classe I con la tasca occupata da un peptide endogeno, e molecole di classe II senza peptide. Queste, trasportate in endosomi perdono la catena Ii e acquisiscono così la proprietà di fissare gli eventuali peptidi esogeni che incontrano.

Le due vie di trasporto dei peptidi endogeni e esogeni non sono separate in modo assoluto e dei passaggi dall'una all'altra sono possibili. Così peptidi di alcune proteine virali, prodotte nel citosol, come proteine dell'HBsAg (Jin e coll. 1988) e del virus influenzale (Hackett e coll. 1991) possono essere presentati da molecole HLA di classe II, mentre proteine internalizzate possono essere processate nel RE e presentate da molecole HLA di classe I. In particolare, il ciclo endogeno per la presentazione da parte di molecole HLA di classe II può seguire tre vie differenti: 1) peptidi prodotti nel citosol entrano nel sistema vacuolare attraverso il RE e seguono la via Citosol-> RE-> Golgi-> Lisosomi (o endosomi)-> molecole HLA di classe II; 2) peptidi prodotti da proteine locate nel RE possono competere con la catena invariante Ii nel legame con molecole HLA di classe II di nuova sintesi; 3) peptidi derivati da proteine endogene trasportate alla superficie della cellula, reinternalizzate e processate nel compartimento vescicolare, e qui captati da molecole MHC di classe II. In generale, i peptidi endogeni, trasportati da molecole HLA di classe I sono riconosciuti da linfociti CD8+ e quelli trasportati da molecole HLA di classe II da linfociti CD4+.

Le tappe di distensione, processazione e trasporto dei peptidi endogeni e esogeni, con la consegna nelle sedi già indicate alle molecole HLA sono assicurate dalle proteine HSP, TAP e LMP di cui si fa cenno in un apposito paragrafo.

La seconda funzione è quella che serve alla costruzione del repertorio T cellulare individuale. Questa è svolta dalle molecole HLA di classe I e di classe II in due tappe successive. La prima, in sede timica, dove le molecole HLA espresse sulla superficie delle cellule endoteliali sono riconosciute dalle cellule T grazie al loro recettore TCR. Le cellule T con recettore specifico per le molecole HLA self vanno incontro ad amplificazione, mentre quelle con recettore specifico per molecole HLA non-self vengono eliminate fisicamente o funzionalmente. E' questa la tappa detta anche di selezione positiva che riduce il repertorio T cellulare iniziale a un insieme di cellule capaci di

riconoscere esclusivamente le molecole HLA self.

La seconda tappa, avviene parzialmente in sede timica e in parte in sede linfoide periferica. Qui le cellule T- specifiche per peptidi self (presentati dalle molecole HLA self) vanno incontro a delezione fisica o funzionale mano a mano che incontrano tali peptidi. Le cellule T specifiche per peptidi non-self (presentati anche questi da molecole HLA self) andranno incontro ad amplificazione ogni qualvolta incontreranno negli organi linfoidi i peptidi specifici (v. capitolo 12).

9.4. Polimorfismo HLA

Come appare evidente dalle tabelle che riportano gli alleli e le specificità relative ai vari loci, il sistema HLA è il sistema genetico più polimorfico finora conosciuto. Poiché ogni individuo ha due aplotipi HLA e in ciascun locus può avere due alleli identici (omozigote) o due alleli differenti (eterozigote), se si considerano solamente i loci DP, DQ, DR, B, Cw e A è facile calcolare che il numero di possibili combinazioni genotipiche differenti (cioè il numero di possibili individui genotipicamente differenti) per questo sistema è di $>1 \times 10^{19}$, e che il numero di possibili combinazioni fenotipiche è di 4×10^{14}.

I meccanismi genetici che hanno prodotto un tale polimorfismo non sono completamente conosciuti, ma sono sicuramente connessi col ruolo immunologico delle molecole HLA. Per capire bene la genesi dell'attuale polimorfismo HLA bisogna considerare due ordini di fattori diversi: 1) i fattori responsabili dei cambiamenti avvenuti nella struttura dei geni HLA e nella loro organizzazione; 2) i fattori responsabili della conservazione e di tali cambiamenti e del loro accumularsi progressivo.

I cambiamenti della struttura dei geni HLA sono dovuti a mutazioni puntiformi, ricombinazioni, delezioni e inserzioni, ma principalmente a conversione genica. Il numero di mutazioni verificatisi nei geni HLA è talmente elevato che, tenuto conto della frequenza media degli eventi mutanti nel genoma umano, è stato ipotizzato che la maggior parte degli alleli HLA attualmente presenti nell'uomo sia comparsa prima della speciazione umana (polimorfismo transpecie) (Klein e coll. 1989). Alternativamente bisognerebbe ammettere che la frequenza delle mutazioni nei geni HLA sia stata molto più alta di quella che si verifica mediamente nel genoma umano. E' possibile che eventi di conversione genica si siano verificati nella regione HLA più frequentemente che in altre regioni del genoma umano. L'esistenza di un polimorfismo transpecie nella regione HLA sembra essere comunque molto probabile. Rimane peraltro da capire perché praticamente tutte le mutazioni verificatesi nei geni HLA siano state mantenute, come sembra dimostrare il fatto che non c'è differenza significativa tra il numero di mutazioni riguardanti la prima e la seconda base dei codoni dei geni HLA e quelle riguardanti la terza base. Infatti le sostituzioni nella terza base non danno luogo a cambiamenti di aminoacidi nel 72% dei casi, e sono quindi generalmente silenti e perciò neutre, mentre le sostituzioni nella prima e nella seconda base portano a cambiamenti di aminoacidi rispettivamente nel 95 e nel 100% dei casi. Queste osservazioni hanno suggerito che il polimorfismo dei geni HLA sia neutro, per cui in una popolazione finita il numero di alleli attualmente presenti è il risultato del bilancio tra le mutazioni e l'estinzione di geni per deriva genetica. Tuttavia il ruolo delle molecole HLA nella

presentazione dei peptidi non-self ai linfociti T, la differente affinità di tali molecole per i peptidi antigenici e la loro differente attitudine a indurre risposte T linfocitarie specifiche, che implica una differente suscettibilità individuale alle infezioni a seconda del fenotipo HLA, fanno ritenere improbabile la neutralità delle molecole HLA nei confronti degli agenti infettivi. A conferma di ciò, studi recenti condotti in Africa hanno dimostrato un forte vantaggio selettivo dell'antigene HLA-B53 nei confronti dell'infezione malarica (Hill e coll. 1991). L'ipotesi che il polimorfismo HLA sia mantenuto da una costante pressione selettiva favorevole agli eterozigoti, in generale, contro gli omozigoti (Flaherty 1988) sembra più adeguata all'insieme delle osservazioni. Come è stato già precisato nei paragrafi precedenti la capacità degli individui di difendersi dagli agenti infettivi, presenti nell'ambiente in numero molto elevato, dipende anche dal numero di differenti molecole HLA di cui egli dispone per la presentazione dei peptidi antigenici. Gli eterozigoti possono perciò difendersi in generale più efficacemente degli omozigoti. A livello di popolazione questo si traduce in una tendenza al mantenimento degli alleli rari e dunque di tutti i nuovi alleli, e il vasto polimorfismo che ne consegue offre le maggiori garanzie di sopravvivenza. Altri meccanismi devono essere considerati come la selezione e le migrazioni.

9.5. HLA e malattie

Il ruolo essenziale del sistema HLA nei meccanismi di difesa immunitaria e il suo straordinario polimorfismo hanno suggerito, fin dal 1967, la possibilità di un suo coinvolgimento nella patogenesi di malattie immunologiche (Amiel e coll. 1967). Lo studio sistematico della distribuzione degli antigeni HLA in oltre 500 malattie diverse ha permesso di dimostrare l'esistenza di significative associazioni tra antigeni HLA dei diversi loci e numerose malattie di natura immunologica e non immunologica.

Un elenco aggiornato delle associazioni finora dimostrate è riportato nella tabella 9.

Senza volerci addentrare in una trattazione dettagliata dei vari aspetti di questa problematica che esula dagli scopi del nostro lavoro, può essere tuttavia opportuno precisare alcuni punti.

L'associazione tra un antigene HLA e una malattia è rivelata generalmente da una variazione (aumento o diminuzione) statisticamente significativa della frequenza di quell'antigene fra i pazienti rispetto agli individui sani della stessa popolazione. L'aumento di frequenza (associazione positiva) esprime un rischio relativo (RR) aumentato di contrarre la malattia per chi possiede quell'antigene rispetto a chi non lo possiede (suscettibilità o predisposizione genetica alla malattia). Invece la diminuzione di frequenza dell'antigene nei pazienti esprime un rischio relativo diminuito di contrarre la malattia per chi possiede quell'antigene rispetto a chi non lo possiede (protezione o resistenza alla malattia).

Per quanto riguarda il significato genetico dell'associazione, bisogna considerare alcune situazioni diverse. La prima è quella in cui l'allele associato sembra essere direttamente coinvolto nella suscettibilità alla malattia. E' il caso delle malattie associate con lo stesso allele in tutte le popolazioni esaminate, come la Spondiloartrite anchilosante, più o meno fortemente associata ad HLA-B27, e come la malattia di Behçet e la malattia

HLA	***Malattia associata***	***RR***	***Osservazioni***
A1	M. di Hodgkin	1.4-2	
“	Deficit di IgA	13	
A3	Emocromatosi idiopatica	8	
A29	Retinopatia “Bird Shot”	50	
B18	M. di Hodgkin	5	
B27	Spondilite anchilosante	80-120	
“	S. di Reiter	30-50	
“	Artrite reattiva	30-50	
“	Uveite anteriore acuta	10	
B35	Tiroidite di De Quervain	14	
B46	Cancro naso-faringeo	2	
B47	Deficit di 21-OH (forma congenita)	16	Iperplasia congenita delle surrenali
B14	Deficit di 21-OH (forma tardiva)	40	
B51	M. di Behcet	6	
B53	Malaria	0.6	Antigene di resistenza insieme a DRB1*1302
Cw6	Psoriasi volgare	13	
DR1	Lichen Ruber Planus primitivo	6-14	Sopratutto la forma cutanea
“	Basaliomi cutanei multipli	4	
DR2	Narcolepsia	100-135	
“	Neurite ottica	2	
“	Sclerosi multipla	4	Non associata al DR2 Dw21
“	S. di Goodpasture	16	
“	M. di Basedow	2	In p. sardi specie con oftalmopatia
DR3	IDDM	3-6	RR per DR3/DR4=40-50
“	Porpora alloimmune	72	
“	S. Nefrotica del bambino (forma cortico-resistente)	3	
“	Nefropatia da sali d’oro	5	
“	Vasculite reumatoide	7	
“	G.Nefrite extramembranosa	12	
“	Tiroidite di Hashimoto	3	
“	M. di Addison	6	
DR3	Myastenia Gravis	3	
“	LES	6	
“	Dermatomiosite	4	
“	M. Celiaco	11	RR per DR3/DR7 = 60
“	Cirrosi biliare primitiva	8	

(segue)

“	Epatite cronica attiva	2	
“	S. di Guillain Barré cronica	5	
“	Dermatite erpetiforme	15	
DR4	Artrite reumatoide	2-10	
“	IDDM	3-5	RR per DR3/DR4 = 40-50
“	M. di Berger	4	
“	Pemfigo	5-14	
DR5	Sarcoma di Kaposi classico	4-9	
“	“ “ “ in AIDS	3	
“	Seminoma	3	
“	Artrite reumat. giovanile	5	
DR6	Pemfigo	5-21	In p. sardi, israeliani e giapponesi
DR7	M. Celiaco	6	
“	Carcinoma tiroideo	4	
“	S.Nefrotica del bambino (forma cortico-sensibile)	7	
DR8	Artrite reumat. giovanile	7	
DRw52a	S. Sjogren primitiva	5	
“	M. di Basedow	5-17	DRw52b è fattore di resistenza
DQw2	IDDM	3-12	Non Asp-57 RR=55-107
DQw3 (w8)	IDDM	2-15	“ “ “ “ “ “
“	Leucemia da HTLV-1	4	
“	Neoplasia cervic. intraep. -> Carcinoma a c. squamose	2.5	
DQw6	Narcolepsia	56	
DPw5	Leucemia linfoblastica	7	

Tabella 9. Antigeni HLA e malattie associate.

di De Quervain, rispettivamente associate in tutte le etnie agli alleli B51 e B35.

La seconda situazione è quella in cui l’allele associato non ha alcun ruolo nella suscettibilità alla malattia, ma è semplicemente un marcatore del gene responsabile della malattia, che è situato a una certa distanza sullo stesso gamete e col quale è in linkage disequilibrium (LD) più o meno forte. E’ il caso dell’allele A3 (aplotipo A3 B14) nei confronti dell’Emocromatosi idiopatica, dell’allele B47 (aplotipo B47 BfF DR7) nei confronti della forma congenita di deficit della 21-OH con iperplasia delle surrenali, dell’allele B14 (aplotipo B14 BfS DR1) nei confronti della forma tardiva di deficit della 21-OH, dell’aplotipo A25 Cw5 B18 DR2 nei confronti del deficit congenito del C2, dell’aplotipo B8 BfS DR3 nei confronti del deficit del C4A (allele C4AQ0) e dell’aplotipo B18 BfF1 DR3 nei confronti del deficit del C4B (allele C4BQ0).

In altri casi l’allele HLA è associato a una malattia con chiara componente genetica, ma della quale i meccanismi e i fattori genetici in gioco sono sconosciuti. L’allele HLA può essere un marcatore “innocente” della suscettibilità genetica alla malattia, ma può essere in alcuni casi direttamente responsabile di questa. L’associazione rivela tuttavia l’esistenza nella regione HLA o vicino a questa di uno o più fattori di predisposizione

genetica alla malattia, benché questa possa essere anche una malattia polifattoriale condizionata da più geni non tutti situati nella regione HLA. E' questo il caso di molte malattie HLA associate, come il Diabete insulino-dipendente (IDDM), il morbo di Basedow, l'Artrite reumatoide, il LES, la Sclerosi multipla, il morbo Celiaco, il Pemfigo, etc., tutte di eziologia sconosciuta o incerta e di genesi autoimmune. In questi casi la forza dell'associazione, a parità di tempo intercorso dalla comparsa del gene di suscettibilità, dipende dalla distanza tra l'allele HLA marcatore e il gene di suscettibilità. Più aumenta tale distanza più aumenta la probabilità di ricombinazione tra i due geni, e più si riduce la frequenza dell'associazione della malattia con l'allele HLA marcatore. Sarà inoltre possibile, per effetto di ricombinazioni, che la malattia risulti associata con due o più alleli HLA situati nello stesso locus o in loci diversi. In quest'ultimo caso, la forza dell'associazione sarà progressivamente maggiore con alleli situati in loci via via più vicini al gene di suscettibilità. L'aumento progressivo della forza dell'associazione sarà quindi indicativo della direzione in cui si trova nel cromosoma il gene di suscettibilità rispetto agli alleli associati. Un buon esempio di questo è dato dal IDDM. Le prime associazioni sono state dimostrate nei confronti degli alleli HLA-B8, B15 e B18 con RR tra 1,5 e 2,5, e, con minore evidenza, nei confronti degli alleli A1 e A30 rispettivamente in LD nelle popolazioni Caucasiche con B8 e B18. Successivamente, associazioni più forti sono state osservate tra IDDM e gli antigeni HLA-DR3 e DR4 (RR=3-6) e ancora più forti con gli antigeni HLA-DQw2 e DQw8 (RR fino a 12-15) e in particolare con le specificità DQ caratterizzate dalla mancanza dell'acido aspartico nella posizione 57 della catena DQβ (non-Asp 57) nella tasca dei peptidi (RR=55-107). Così è apparso evidente, che la suscettibilità al IDDM debba risiedere, se non proprio negli alleli DQ non-Asp 57, sicuramente in fattori genetici situati centromericamente e in forte LD con questi.

Il significato patogenetico delle associazioni resta ancora da definire. A parte i casi in cui l'allele HLA associato è solamente un marcatore genetico in LD con il gene di malattia, sono stati invocati: meccanismi di mimetismo tra agenti infettivi e molecola HLA associata, con conseguente autoimmunità o al contrario tolleranza dell'agente infettivo; fenomeni di autoimmunità da parte di cloni T self specifici, sfuggiti alla selezione negativa, nei confronti di peptidi self; fenomeni di allogenizzazione della molecola HLA associata, da parte di agenti esterni (virus, sostanze chimiche); e funzioni recettoriali di epitopi delle molecole HLA associate. Sicuramente la struttura molecolare della cavità dei peptidi può essere un importante fattore nella genesi di alcune malattie HLA associate.

10. Gli Induttori della Risposta Immune

La risposta immunitaria da parte dei linfociti non è sempre e necessariamente dipendente da un riconoscimento specifico di antigeni a livello dei recettori idiotipici Ig e TCRαβ. Esiste in natura una grande varietà di molecole capaci di indurre l'attivazione e la proliferazione di numerosi cloni linfocitari senza una precisa specificità antigenica. Nell'insieme tutte le molecole capaci di indurre attivazione e proliferazione linfocitaria possono essere incluse tra gli induttori della risposta immune, e possono essere distinte in 3 categorie diverse a secondo del grado di specificità col quale agiscono sulle cellule bersaglio. Una prima categoria è rappresentata dagli induttori o attivatori policlonali che inducono la proliferazione di un vasto numero (anche se non di tutti) di cloni linfocitari T e/o B. Un secondo gruppo che possiamo denominare induttori o attivatori oligoclonali T è rappresentato da molecole capaci di indurre attivazione e proliferazione solamente di un numero limitato di cloni ed esattamente di quelli che possiedono una determinata sequenza Vβ nel recettore TCR. Una terza categoria è quella della grande maggioranza degli antigeni che agiscono su un solo clone cellulare attraverso l'interazione specifica con i recettori idiotipici T e B, e che possono pertanto essere denominati induttori o attivatori monoclonali. Di questi ultimi è stato detto diffusamente in diversi paragrafi, e si parlerà specificamente a proposito dei meccanismi di presentazione, di riconoscimento e della risposta effettrice sia T che B (v. Arras e Contu 1992), e pertanto saranno considerati molto brevemente in questo capitolo.

10.1. Induttori policlonali

Come già detto queste molecole agiscono su strutture "recettoriali" della membrana linfocitaria differenti dai recettori Ig e TCR, deputati al riconoscimento specifico degli antigeni, rispettivamente nei B e nei T linfociti. Alcuni di essi agiscono solamente sui B linfociti, altri solamente sui T linfociti, e altri ancora su entrambi. Tra gli attivatori B, quelli più conosciuti sono il LPS (lipopolisaccaridi di batteri gram-negativi), il cui recettore linfocitario non è stato ancora identificato, e che induce essenzialmente la produzione di IgM; il SAC (stafilococco aureo Cowan I) i cui recettori sulla membrana linfocitaria sembrano essere il CD32 e le IgM, e la cui attività B-mitogenica e T-indipendente, è capace di indurre nei B la produzione di Ig in assenza dei T linfociti o di IL-2; il EBV (virus di Epstein Barr), il cui recettore linfocitario è il CD21, è comunemente usato per produrre linee linfoblastoidi B. In un paragrafo successivo sull'attività dei B linfociti verrà affrontato il problema degli antigeni T-indipendenti e T-dipendenti e del meccanismo attraverso il quale viene indotta la risposta B nei due casi.

Tra gli attivatori T quelli più noti e comunemente usati in laboratorio come mitogeni sono la ConA (Concanavalina A), la PHA (Fitoemoagglutinina) e il PWM (Pokeweed mitogen). La ConA stimola esclusivamente i T linfociti interagendo con mannosidi e glicosidi presenti sulla membrana. La PHA è principalmente un mitogeno T (il suo

recettore è la N-Acetil-D-galattosamina), mentre il PWM può indurre proliferazione policlonale sia dei T che dei B linfociti. Il suo recettore non è conosciuto. Un'azione analoga a quella degli attivatori policlonali ora descritti può essere svolta sia su linfociti B che su linfociti T anche da anticorpi monoclonali rivolti contro specifici recettori di membrana come verrà precisato di volta in volta più avanti.

10.2. Induttori oligoclonali (Superantigeni)

Sono degli attivatori oligoclonali T, e si differenziano dagli attivatori policlonali T in quanto: 1) inducono l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$ appartenenti a più cloni differenti; 2) sono riconosciuti dal TCR a livello di particolari sequenze della superficie esterna della regione Vβ, indipendentemente dalla specificità idiotipica del TCR; 3) sono presentati ai linfociti T da molecole MHC di classe II senza preliminare processazione da parte della cellula presentante e pertanto la loro azione è MHC dipendente ma non ristretta; 4) tutti i cloni T $CD4^+$ che possiedono nel TCR lo stesso segmento Vβ "specifico" per un dato superantigene (appartengono a una stessa famiglia Vβ) sono attivati e indotti a proliferare dal contatto con quel superantigene.

Finora sono stati particolarmente studiati nell'uomo i superantigeni di origine batterica, e gli studi sui superantigeni virali e autologhi sono stati condotti principalmente nel topo, ma i dati disponibili fanno ritenere che anche in questo caso ciò che è stato osservato nel topo avrà un corrispettivo nell'uomo.

Tra i superantigeni batterici devono essere ricordate le tossine stafilococciche capaci di indurre la proliferazione di numerosi cloni T $CD4^+$ con TCR Vβ2. Sono state studiate 6 differenti tossine stafilococciche denominate SEA, SEB, SEC, SED, SEE e TSST. Le cellule T che rispondono a queste endotossine si differenziano tra loro nel gene Vβ che esprimono sul TCR. Cioè, le cellule che rispondono a una di queste tossine hanno tutte nel TCR una comune sequenza Vβ che è differente dalla sequenza Vβ presente nelle cellule che rispondono a un'altra tossina. La capacità di rispondere a una endotossina dipende esclusivamente dalla sequenza Vβ presente nel TCR ed è indipendente dagli altri componenti del TCR, cioè Vα e i segmenti J o D. Analoghi risultati sono stati ottenuti nel topo e nell'uomo. Così l'enterotossina SEB stimola nel topo linfociti T con Vβ 3, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 17 e nell'uomo linfociti con Vβ 3, 12, 14, 15, 17, 20. Invece l'enterotossina SEE stimola nel topo cellule T con Vβ 11, 15, 17, e nell'uomo cellule T con Vβ 5.1, 6.1, 6.2, 6.3, 8, 18. Infine l'enterotossina TSST, responsabile di shock tossico, stimola nel topo linfociti T con Vβ 3, 15, 17 e nell'uomo linfociti T con Vβ2. Queste risposte necessitano della presentazione della enterotossina da parte di molecole MHC di classe II. Perciò le cellule T rispondenti sono generalmente $CD4^+$. Come è stato già precisato i superantigeni e le enterotossine, nel caso particolare, non devono essere necessariamente sottoposte in via preliminare a processazione da parte delle cellule APC, ma possono essere presentate dalle molecole MHC direttamente come tali sulla superficie esterna distale della molecola (α-elica della catena α o β) in un sito diverso dalla tasca dei peptidi (v. fig. 14).

Non è stato stabilito se il polimorfismo delle molecole MHC influisce sulla presentazione di questi antigeni.

Risultati di un certo interesse sui superantigeni sono emersi dallo studio di alcuni

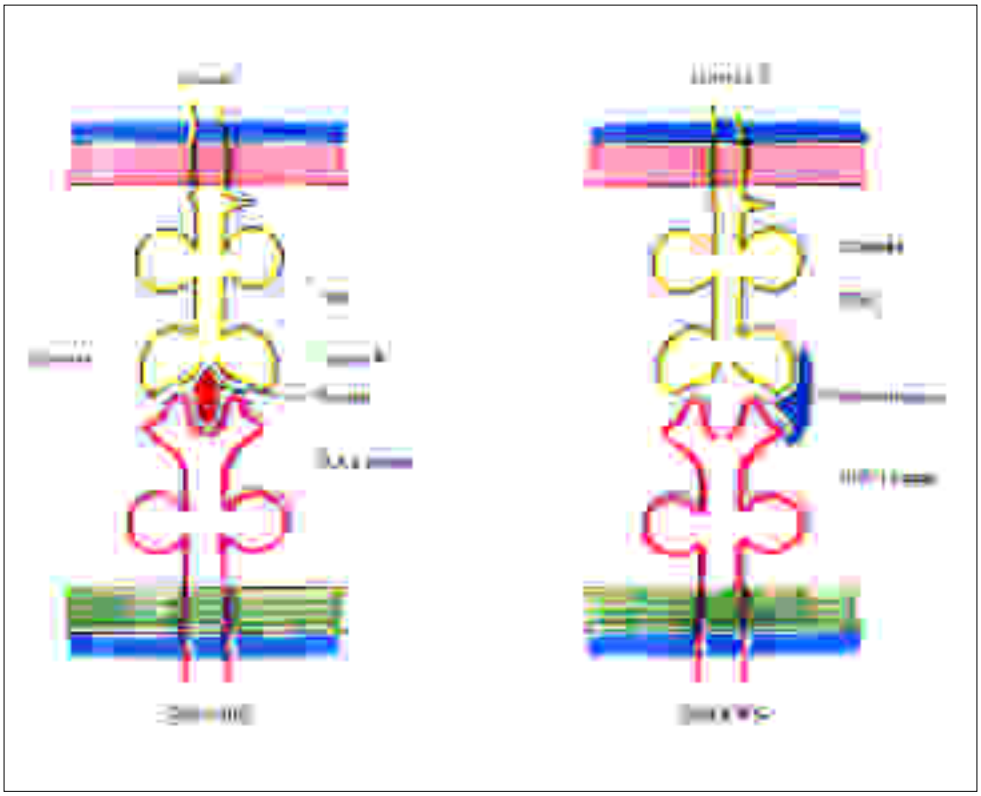


Figura 14. Modalità di legame tra TCR e molecola HLA di classe II nel caso di presentazione di un peptide (a sinistra) e nel caso di inserimento a ponte di un superantigene (a destra). Il peptide è presentato nella tasca apposita della molecola HLA ed è riconosciuto dal TCR a livello della superficie idiotipica. Il superantigene si lega sulla superficie esterna dell'α-elica della molecola HLA e sulla superficie esterna della porzione variabile della catena β (regione Vβ) del TCR.

virus e in particolare dei retrovirus. E' stato dimostrato che il virus tipo C del tumore mammario murino ha proprietà di superantigene dovute a una proteina codificata nel 3'LTR. Più recentemente è stato suggerito che anche il virus HIV produca un superantigene responsabile della progressiva diminuzione dei linfociti T $CD4^+$ nei pazienti con AIDS (Imberti e coll. 1991). Questo è stato dedotto dalla osservazione che nei linfociti T di tali pazienti non erano dimostrabili le sequenze Vβ 14, 15, 16 e 18 e raramente dimostrabili le sequenze Vβ 17, 19 e 20, indipendentemente dall'assetto del TCR per quanto riguarda le altre componenti. Un'aspetto particolarmente interessante degli studi condotti su questa categoria di antigeni riguarda il loro intervento nella determinazione del repertorio T cellulare in quanto superantigeni self. Nel topo è stato osservato che l'utilizzazione del gene Vβ 17a realizza un TCR con specificità per un antigene self associato

esclusivamente con linfociti che esprimono molecole MHC I-E di classe II. Nei ceppi di topo che esprimono molecole MHC I-E non ci sono virtualmente cellule T che esprimono TCR con sequenze Vβ 17a negli organi linfoidi periferici o nella midollare timica, mentre sono presenti nella corticale timica. Al contrario i ceppi di topo che non esprimono molecole I-E per un difetto genico hanno cellule T con sequenze Vβ 17a sia nel timo che in periferia. Questo dimostra che nei topi I-E positivi i timociti maturi con TCR Vβ 17a incontrano un superantigene self presentato da molecole I-E e vengono deleti (selezione negativa). Invece nei topi I-E negativi i timociti con TCR Vβ 17a non incontrano tale complesso superantigene MHC I-E, e maturano normalmente. Poiché la presenza o l'assenza delle sequenze Vβ 17a riguarda non solo i linfociti $CD4^+$ ma anche quelli $CD8^+$, e poiché i superantigeni sono presentati da molecole MHC di classe II e quindi agiscono sui linfociti T $CD4^+$, se ne deve dedurre che negli esperimenti sopra riportati la selezione negativa avvenga a livello timico su cellule $CD4^+$ $CD8^+$. E' possibile che anche antigeni minori di istocompatibilità possano comportarsi da superantigeni. Nel topo dei geni polimorfici denominati Mls (Minor lymphocyte stimulating antigen) codificano per molecole in grado di dare forti MRL positive anche fra individui identici per tutti i loci MHC. Tali prodotti si comportano da superantigeni in quanto una data differenza allelica Mls stimola virtualmente tutte le cellule T che esprimono sul TCR una particolare sequenza Vβ. Purtroppo mancano finora dati sperimentali che provino l'esistenza anche nell'uomo di un analogo processo di selezione negativa intra-timica operata da superantigeni self.

L'interesse per i superantigeni non riguarda solamente il meccanismo attraverso il quale essi inducono una risposta T linfocitaria multiclonale, ma si estende al ruolo che ad essi oggi deve essere riconosciuto nella patologia. In particolare va ricordato che l'attivazione dei linfociti T $CD4^+$, in quanto coinvolge mediamente il 20% di tali cellule (rispetto allo 0.1% nel caso di stimolazione da parte di normali antigeni), si accompagna a una massiccia liberazione di IL-2 che è responsabile dei quadri di tossi-infezione alimentare dovuti alle enterotossine stafilococciche, caratterizzati da nausea, vomito, diarrea e febbre, fino alla grave ipotensione e allo shock. L'attivazione aspecifica di un così grande numero di cloni T CD4+ comporta come conseguenza la possibilità che casualmente siano amplificati anche dei cloni T e/o dei cloni B auto-reattivi con comparsa di quadri di malattie autoimmuni con variabile bersaglio cellulare e/o umorale, come per es. LES, Artrite reumatoide, Sclerosi multipla, etc.

In maniera analoga possono essere dovute a superantigeni amplificazioni di cloni T soppressori con conseguente induzione di stati di immunodepressione. Questi possono essere peraltro realizzati da superantigeni attraverso l'esaurimento funzionale o la delezione dei cloni T con sequenze Vβ specifiche.

10.3. Induttori monoclonali

Sono rappresentati dai siti epitopici delle proteine riconosciuti da una specifica struttura idiotipica anticorpale o T recettoriale. Un determinato epitopo è immunogenico nella misura in cui è in grado di indurre un'amplificazione del clone T o B linfocitario che lo riconosce specificamente. Una proteina possiede di solito un grande numero di

siti antigenici differenti in grado di indurre attivazione dei singoli cloni linfocitari. Ciò garantisce una maggior efficienza della difesa nei confronti della proteina estranea. In generale si tratta di epitopi discontinui costituiti da insiemi di brevi sequenze aminoacidiche situate a una certa distanza l'una dall'altra nella proteina che possono essere assemblati grazie alla flessibilità della proteina stessa. La grande maggioranza degli antigeni esistenti in natura, attivi sul sistema immunitario, appartiene alla categoria degli induttori monoclonali.

I cloni linfocitari specifici per epitopi differenti sono un numero estremamente elevato in un organismo che supera largamente il numero teorico di differenti epitopi antigenici esistenti in natura. Per ciascun epitopo possono esistere in un organismo mediamente da 10 a 100 cellule che compongono il clone specifico. Se si calcola che il numero dei linfociti T o B è approssimativamente $1 \times 10^{12-15}$ il repertorio T o B è in grado di reagire a 10-100 miliardi di antigeni differenti.

11. I Meccanismi Effettori della Risposta Immune

L'obiettivo della risposta immune è l'eliminazione degli agenti estranei (batteri, virus, miceti, c. tumorali, c. allogeniche, proteine etc.) penetrati nel nostro organismo. Questo viene conseguito attraverso una serie di operazioni e procedure che coinvolgono cellule e fattori umorali diversi, in un insieme perfettamente coordinato e autoregolato per ottenere il massimo risultato difensivo col minimo danno possibile.

Le attività effettrici cellulari sono messe in opera essenzialmente da linfociti T citotossici, da cellule NK e da macrofagi, con meccanismi diretti e mediati, esposti in dettaglio in appositi paragrafi ai quali si rimanda. L'attività effettrice umorale è realizzata principalmente dal sistema del complemento, dalle immunoglobuline e dalle citochine che mediano l'immunità naturale (IFNα e β, TNF, IL-1, IL-6 e IL-8). Le immunoglobuline e le citochine sono trattate a parte in appositi paragrafi nella Parte terza di questo lavoro (Arras e Contu 1992). Qui viene esposto nei suoi aspetti essenziali il sistema del complemento.

11.1. Il Complemento

Schematicamente il sistema è strutturato in due vie indipendenti di attivazione che convergono, ad Y, in una via finale comune fino alla polimerizzazione del fattore C9 nella membrana attivante e alla lisi della cellula bersaglio (v. fig. 15).

Le prime due vie, dette via classica e via alterna, portano entrambe alla formazione dapprima di una C3 convertasi, che catalizza l'attivazione proteolitica del C3, e quindi di una C5 convertasi che, con l'attivazione del C5, avvia la tappa finale del sistema.

Via classica

E' la principale via effettrice della risposta immune anticorpo-mediata. E' infatti attivata essenzialmente dal legame del C1 (primo componente di questa via) ai siti Fc di anticorpi legati ad antigeni. Può essere suddivisa in tre tappe. La prima porta all'attivazione del C1, la seconda alla formazione della C3 convertasi classica, e la terza realizza la C5 convertasi che produce il C5b.

Prima tappa. Inizia con l'attivazione del C1 in seguito al legame di questo con i complessi antigene-anticorpo. Il C1 è un grande complesso molecolare pentamerico di 750 kD composto da una subunità C1q associata con 2 molecole C1r e 2 molecole C1s. La subunità C1q è quella che si lega ai siti Fc delle Ig, mentre C1r e C1s sono responsabili della progressione della cascata proteolitica. Il C1q è composto da 6 subunità molecolari a forma di tulipano, ciascuna formata da 3 catene polipeptidiche di 3 tipi differenti (A, B, e C) avvolte insieme a tripla elica in una sequenza collageno-simile a forma di stelo, verso l'estremo aminoterminale, e assumenti una forma globulare all'estremità carbossiterminale. Le 6 subunità sono riunite insieme a due a due per gli "steli" in una struttura complessa che è stata paragonata a un mazzo di tulipani.

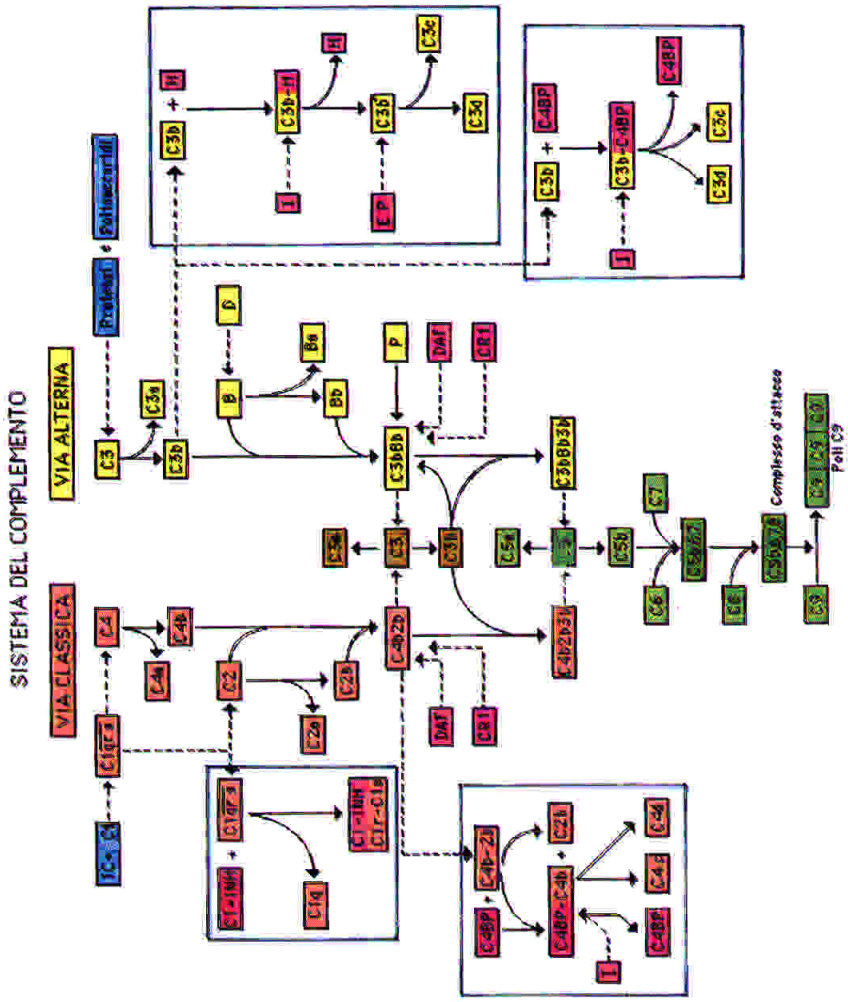


Figura 15. Schema dell'attivazione del complemento attraverso la via classica, la via alterna e la via finale comune, e dei principali meccanismi di regolazione.

L'attivazione del C1 avviene in modo significativo quando si fissa ai dominî CH3 delle IgM o CH2 delle IgG. Ma mentre è sufficiente una sola molecola di IgM, sono necessarie almeno due molecole di IgG per ottenere tale attivazione. Inoltre solo alcune sottoclassi di IgG sono capaci di attivare il C1, ed esattamente, in ordine decrescente, le IgG_3, le IgG_1, le IgG_2, e non le IgG_4. Questo sembra dipendere dalla lunghezza della regione cerniera delle IgG e dalla loro flessibilità. Solamente Ig complessate con anticorpi, e non libere, sono in grado di attivare il C1, poiché la regione Fc delle Ig libere è inaccessibile al C1 e diviene accessibile solo in seguito a cambiamenti conformazionali indotti dal legame con l'antigene.

L'attività catalitica del C1 dipende dal C1r e dal C1s. Queste, entrambe molecole monomeriche di 85 kD, si combinano tra loro in presenza di Ca^{++} a formare un tetramero $C1r_2$-$C1s_2$ che si lega al C1q tra i 6 "steli", in modo da giustapporre al centro i dominî catalitici di C1r e di C1s. Il legame di due o più regioni Fc delle Ig al C1q causa l'attivazione autocatalitica del C1r, con formazione di un frammento di 28 kD (C1r) dotato di attività serino-esterasica, che a sua volta taglia le molecole C1s dando luogo ad altri frammenti di 28 kD (C1s) con attività serino-esterasica, attivi sui due componenti della via classica C4 e C2. Una regolazione di questa tappa è esercitata dal C1-inibitore (C1-INH) che ha la capacità di legarsi stechiometricamente al C1r e al C1s.

Seconda tappa. Il C1s attivato media in questa tappa la formazione della C3 convertasi attraverso due processi di attivazione, uno sul C4 e l'altro sul C2. Il primo è operato mediante clivaggio di un piccolo peptide (C4a) dal C4, con produzione del C4b che si lega in modo covalente alla membrana cellulare vicino al complesso immune. Il secondo consiste in un clivaggio del C2 in due frammenti, uno piccolo (C2a) che non svolge poi alcuna funzione nota, e uno grande (C2b) che è il frammento attivo. Deve essere notato che in alcuni lavori le denominazioni di questi due frammenti appaiono invertite (C2a per il frammento grande e C2b per il frammento piccolo), ma sembra opportuno adottare una nomenclatura uniforme, nella quale i frammenti proteolitici piccoli sono indicati con la lettera *a* e quelli grandi con la lettera *b*. Il clivaggio del C2 può essere effettuato dal C1s sia sul C2 libero che, con maggiore efficacia, sul C2 preliminarmente associato al C4b sulla membrana in un complesso C4bC2. In entrambi i casi il C2b si associa col C4b in un complesso enzimatico C4b2b che è la C3 convertasi classica. Questa reazione è Mg^{++} dipendente.

Terza tappa. Il substrato della C3 convertasi è il C3 che viene clivato in un sito vicino all'aminoterminale della catena α dando luogo a un piccolo peptide di 9 kD (C3a o C3 anafilotossina) e a un peptide più grande, il C3b, nel quale rimane libero un sito thiolestere reattivo che conferisce alla molecola la proprietà di fissarsi alla membrana in vicinanza delle molecole C4b2b. Ne consegue la formazione di un complesso trimolecolare C4b2b3b che è la C5 convertasi. Questo è l'ultimo enzima della via classica il cui substrato specifico è il C5.

Via alternativa

Anche questa via porta attraverso tre tappe successive alla formazione di una C3 convertasi e di una C5 convertasi, con produzione di C5b che si fissa alla membrana cellulare.

Prima tappa. Consiste nell'attivazione del C3. Questo componente svolge un ruolo critico nella fase iniziale della via alternativa che è innescata da una forma modificata di esso, ed esattamente dal C3b, che è di solito generato nella via classica, o dal C3(H_2O) che è prodotto quando il thiolestere interno del C3 circolante và incontro spontaneamente a lenta idrolisi. Entrambe queste due forme del C3 sono capaci di legarsi al fattore B della via alternativa. Il C3b può anche essere prodotto continuamente in circolo in piccole quantità ad opera di enzimi proteolitici fisiologici appartenenti alla categoria delle serinoproteasi. Enzimi di questo tipo e superfici polisaccaridiche attivanti sono presenti in quantità abnorme in corso di infezione e possono causare un forte incremento del clivaggio del C3 in C3a e C3b.

Seconda tappa. Il C3b svolge nella via alternativa un ruolo analogo a quello del C4b nella via classica. Come questo ha la proprietà di legarsi in modo covalente su membrane cellulari e su superfici di aggregati attivanti, come polisaccaridi insolubili. Parallelamente il fattore D (C3-proattivatore convertasi) attiva il fattore B (C3-proattivatore) staccando un piccolo peptide di 33 kD (Ba) e producendo il frammento reattivo (Bb). Questo si lega al C3b sulla membrana realizzando il complesso C3bBb, che è la C3 convertasi della via alterna. L'attività proteolitica del fattore D sul fattore B si svolge con maggiore efficacia se quest'ultimo è preliminarmente legato al C3b in un complesso C3bB, analogamente a quanto abbiamo visto circa l'attività proteolitica del C1s sul C2 nella via classica.

La formazione della C3 convertasi alterna è, come quella classica Mg^{++} dipendente. La C3 convertasi alterna è estremamente labile e si inattiva in circa 5 minuti per la perdita del Bb. La properdina (P) stabilizza questa convertasi, legandosi a questa, in un sito del C3b tra i residui 753 e 786, e formando un complesso C3bPBb che ha un emivita di circa 30 minuti.

Terza tappa. La C3 convertasi alterna è dotata di forte attività proteolitica nei confronti del C3 e produce grandi quantità di C3a (anafilotossina) e di C3b. Questa interagisce sulla superficie attivante con i fattori D e B e forma un nuovo C3bBb, realizzando così un meccanismo di feedback positivo che amplifica lo stimolo iniziale. Il legame di molecole C3b aggiuntive al complesso C3bBb (o C3bPBb) porta alla formazione di nuovi complessi molecolari $C3b_nBb$ o $C3b_nPBb$, con specifica attività C5 convertasica.

Via finale comune

Questa tappa prende avvio con l'attivazione proteolitica del componente C4 da parte di una delle due C5 convertasi (classica o alternativa). Il C5, eterodimero di 190 kD, è implicato in due frammenti, uno di 11 kD (C5a) che è la più potente anafilotossina, e viene rilasciato, e l'altro, il C5b, che è un eterodimero di 180 kD, che rimane associato alla superficie cellulare in una conformazione transitoriamente capace di legare la proteina C6. Questa molecola, monomero di 128 kD, forma col C5b un complesso stabile che è però debolmente associato alla membrana. La fissazione del C7, proteina monomerica di 121 kD, realizza un complesso C5b,6,7, altamente lipofilico capace transitoriamente (circa 10 m.sec.) di legarsi alla membrana inserendosi nel doppio strato lipidico

idrofobico. Se ciò non avviene nel breve tempo disponibile, il complesso si inattiva, altrimenti diviene un recettore integrale di membrana ad alta affinità per la molecola C8. Questa è una proteina di 155 kD composta da 3 catene, 2 (α e γ) legate tra loro da ponti disolfuro, e una (β) legata alla catena α in modo non covalente. La catena β è quella che fissa il C8 al complesso C5b,6,7, mentre la catena α penetra nel doppio strato lipidico della membrana fissandovi stabilmente il complesso C5b,6,7,8. Questo funge da accettore del C9 (proteina monomerica di 79 kD) del quale favorisce l'inserimento nella membrana e la polimerizzazione, con formazione di strutture tubulari transmembrana di circa 119 Å di diametro interno e 160 Å di lunghezza, composte ciascune da 12-18 molecole di C9. Il complesso $C5b,6,7,8,9_n$ è detto anche complesso d'attacco della membrana o MAC.

Regolazione del sistema

Le due vie di attivazione del complemento dispongono di un efficiente sistema di regolazione atto ad impedire gli effetti dannosi di un'eccessiva attivazione. Da una parte le serinoproteasi in gioco e i fattori attivi da essi prodotti (C3b, C4b, Bb, C2b e C5b) sono molecole estremamente labili quando si trovano in fase liquida e dispongono di una relativa stabilità solo quando sono fissati sulla membrana. Dall'altra il sistema dispone di alcuni fattori capaci di modulare specificamente sia la via classica che quella alterna operando essenzialmente a due livelli.

Un primo livello di regolazione riguarda i processi di sintesi delle C3 convertasi e delle C5 convertasi. Nella via classica il C1 inibitore (C1-INH) reagisce con il complesso C1qrs legandosi stechiometricamente con le componenti C1r e C1s e staccando il C1q. Il risultato è l'inibizione della produzione di C4b e di C2b e quindi delle due convertasi classiche (C3 e C5 convertasi) che essi compongono. Nella via alternativa il controllo della sintesi delle due convertasi è realizzato attraverso una preliminare fissazione al C3b del fattore H o del fattore C4BP (C4 binding protein) che formano dei complessi C3b-H e C3b-C4BP. Viene così antagonizzato il legame del C3b col fattore B o col frammento Bb e quindi la sintesi della C3 convertasi alterna e delle due C5 convertasi, tutte necessitanti del C3b. Inoltre la fissazione del fattore H e, con minore efficacia, del fattore C4BP sul C3b, favorisce l'attività proteolitica del fattore I (inattivatore di C3b e di C4b) sul C3b con formazione dei frammenti C3c e C3d.

Un secondo livello di regolazione riguarda il processo di degradazione delle due C3 convertasi. Questo è favorito da 4 fattori: il fattore C4BP che accelera la dissociazione del complesso C4b-C2b, il fattore H che accelera la dissociazione del complesso C3b-Bb, il fattore DAF (decay accelerating factor) e il recettore CR1 che facilitano la dissociazione di entrambi i complessi enzimatici. Il CR1 può agire inoltre da cofattore nel clivaggio del C3b e del C4b da parte del fattore I. Analoga funzione è svolta dalla glicoproteina glicosilata MCP (membrane cofactor protein). I recettori CR1 e CR2 sono responsabili della clearance dei complessi immuni contenenti C3b o C4b, in quanto interagiscono specificamente con queste due proteine. Diversi altri fattori intervengono nella regolazione del sistema complementare. Fra questi devono essere ricordati la proteina S (vitronectina) che si lega specificamente al complesso C5b,6,7 e previene l'inserimento del complesso MAC nella membrana, e la proteina SP40,40 che interagisce col complesso MAC modulandone la formazione.

12. Organizzazione Clonale del Sistema Immunitario

La difesa immunitaria specifica deve avere i seguenti requisiti:

a) capacità di risposta specifica nei confronti di qualunque agente patogeno e quindi di un numero praticamente illimitato di strutture antigeniche non-self;

b) rapidità ed efficienza della risposta nei confronti delle strutture estranee che di volta in volta penetrano nell'organismo;

c) innocuità per le strutture autologhe.

Gli strumenti più idonei per questo sono i linfociti T e B, in quanto:

a) dotati di recettori di riconoscimento degli antigeni altamente specifici, e praticamente esclusivi per antigeni non-self;

b) suscettibili di amplificazione in seguito all'incontro con l'antigene specifico;

c) capaci di circolare continuamente nei vari distretti dell'organismo, e pronti a dislocarsi negli organi linfatici periferici per incontrarvi gli antigeni estranei, nelle condizioni ambientali più adatte alla risposta (v. capitoli 4 e 5);

d) disponibili in numero tale e in tale varietà da poter far fronte a tutti gli antigeni estranei esistenti in natura.

Queste prerogative dei linfociti sono la conseguenza di tre fenomeni di cui si parlerà in dettaglio più avanti:

1- Diversificazione somatica casuale delle strutture idiotipiche di riconoscimento dei linfociti T (TCR) e B (Ig), per cui ogni nuovo linfocita che viene prodotto negli organi linfatici centrali a partire dai precursori è differente da tutti gli altri nella sua specificità antigenica (v. Parte seconda).

2- Organizzazione clonale, per cui ciascun linfocita in possesso di una determinata specificità idiotipica è capace di proliferare dando origine a una progenie di cellule tutte con specificità idiotipica identica a quella della cellula madre (clone). Quindi,

a) un determinato linfocita possiede un solo tipo di specificità idiotipica;

b) un linfocita T o B che incontra l'antigene specifico in condizioni adeguate va incontro ad attivazione e a proliferazione producendo nuovi linfociti T o B tutti con identica specificità idiotipica dei recettori rispettivamente TCR e Ig (amplificazione clonale);

c) tutti i linfociti che possiedono uguale specificità idiotipica appartengono allo stesso clone;

d) esiste almeno un linfocita per ciascun antigene estraneo: gli antigeni esistenti in natura sono valutabili in circa $1 \times 10^7 - 10^9$, e poiché il numero dei linfociti è pari a circa $1 \times 10^{10} - 10^{12}$, potendo arrivare fino a 1×10^{15}, si può calcolare che per ciascun antigene c'è mediamente un numero di cellule pronte a fornire una risposta specifica variabile da 10-100;

3- Selezione clonale, che porta, attraverso due differenti processi di esclusione dei cloni linfocitari B e T self-reattivi, alla realizzazione di due vasti repertori di riconoscimento e di reattività (un repertorio B e uno T) nei confronti degli antigeni non-self.

I linfociti B subiscono, in una fase maturativa precoce, una selezione negativa a carico dei linfociti dotati di idiotipi specifici per le strutture autologhe. Tale selezione è principalmente dovuta all'incontro casuale tra siti o epitopi antigenici autologhi e linfociti B che portano sulla membrana gli idiotipi specifici nella forma di IgM, ma che non hanno ancora espresso IgD. Ne consegue un arresto dello sviluppo maturativo di questi linfociti B e quindi la loro esclusione funzionale (aborto clonale). Restano pertanto solamente i cloni B con Ig specifiche per antigeni non-self. I cloni B con Ig self-specifiche possono essere anche eliminati fisicamente (delezione clonale), oppure possono persistere nell'organismo come cloni composti da un numero molto piccolo di cellule con Ig specifiche per strutture self normalmente non accessibili.

I linfociti T sono sottoposti a un processo selettivo più complesso. Il recettore dei linfociti T, nella concezione finora dominante, è in un certo senso il frutto di una combinazione casuale di due superfici di riconoscimento, una con specificità idiotipica per un sito peptidico estraneo o autologo, e l'altra con specificità per uno qualunque di tutti i possibili epitopi allelomorfici HLA di classe I o II.

Ciascun linfocita T è quindi in origine in grado di riconoscere contemporaneamente una specificità HLA e un determinato peptide. Devono pertanto esistere delle serie di linfociti T ognuna specifica per un determinato allotipo HLA e che possiede insieme un repertorio completo di recettori per tutti i peptidi. A livello timico questo vasto universo recettoriale è sottoposto ad una selezione positiva consistente nel fatto che i timociti che dispongono di recettori specifici per gli allotipi HLA autologhi di I e di II classe portati dalle cellule epiteliali timiche e dalle cellule nurse vengono amplificati, mentre tutti gli altri muoiono. E' infatti noto che nella fase di maturazione intratimica oltre il 95% dei timociti muore. Alla fine di questo processo saranno presenti poche serie di linfociti T ciascuna specifica per una delle molecole HLA autologhe di I e di II classe.

Ciascuna di queste serie avrà inoltre un repertorio di riconoscimento completo per tutti i peptidi self e non-self. Una ulteriore selezione, questa volta negativa, analoga a quella a cui vanno incontro i linfociti B, porterà all'eliminazione (selezione clonale) o all'inattivazione (anergia clonale) di tutti i linfociti T con recettori specifici per peptidi self. Non sappiamo ancora con certezza se questa seconda tappa selettiva avviene esclusivamente nel timo o anche negli organi linfoidi periferici. Alcuni dati suggeriscono una sede intratimica, ma altri dati fanno piuttosto propendere per una sede extratimica. E' molto verosimile che la selezione negativa intesa come delezione di cloni T avvenga nel timo, e che la selezione negativa intesa come anergia dei cloni T avvenga prevalentemente in sede extratimica.

Sembra infatti improbabile che i linfociti T possano incontrare nel timo tutti i peptidi self. Bisogna tener presente che la delezione riguarda cellule T con doppia positività $CD4^+CD8^+$ che hanno espresso il TCRαβ, mentre l'anergia clonale riguarda cellule T con singola positività $CD4^+$ o $CD8^+$ che incontrano il peptide self presentato non da linfociti B o macrofagi ma da cellule incapaci di fornire il secondo segnale (citochine) di attivazione. I cloni T con TCR specifici per HLA non-self e quelli specifici per peptidi self dominanti (eccetto quelli non accessibili) sono eliminati fisicamente o funzionalmente. Al termine di questo lungo e complicato processo schematizzato nella fig.16 rimarrà una popolazione di cloni T dotati di TCR specifici per peptidi non-self (la grande maggioran-

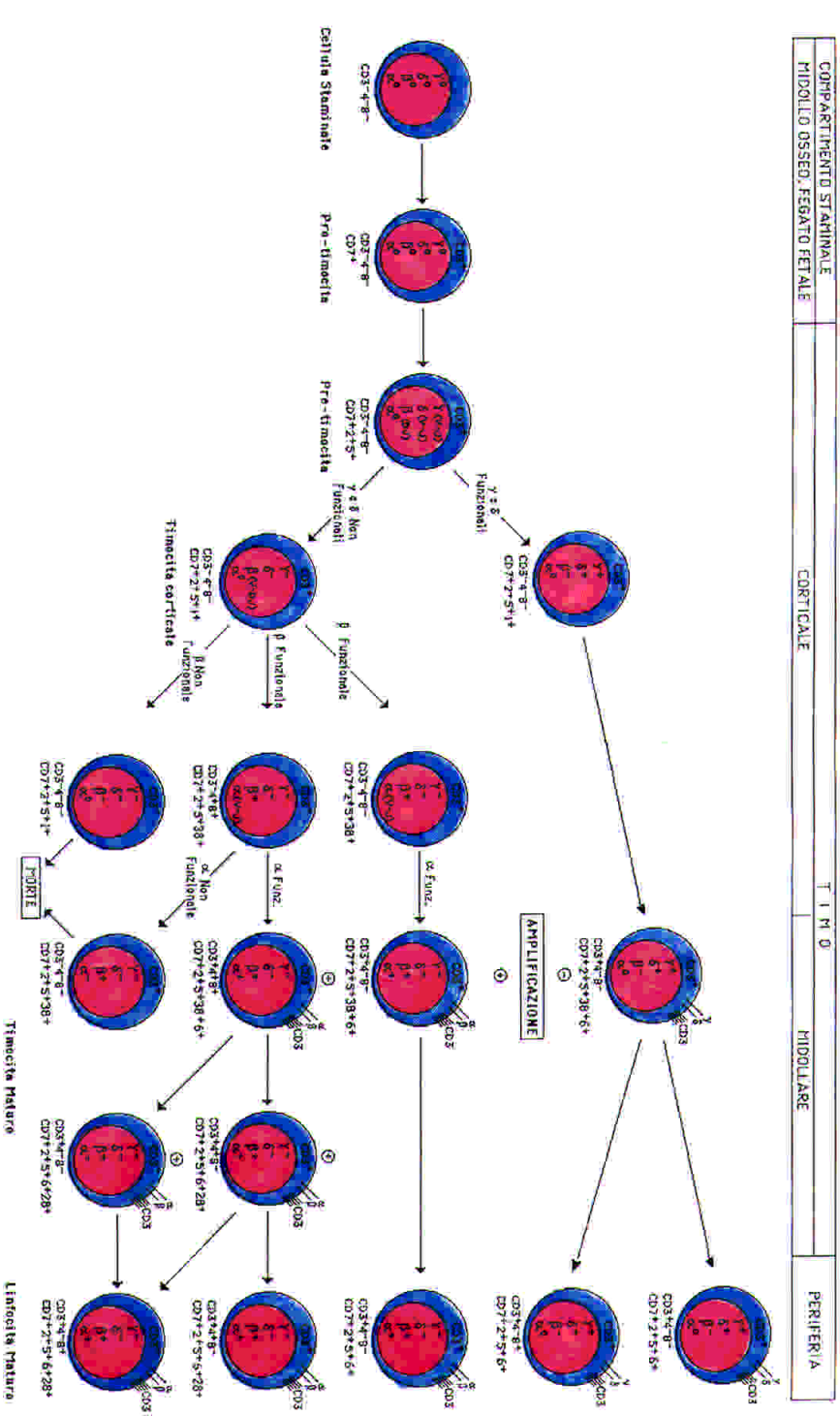


Figura 16. Rappresentazione schematica dell'ontogenesi dei linfociti T con recettori TCR-1 (γβ) e TCR-2 (αβ).

za), o per peptidi self criptici, associati a molecole HLA self (TCRαβ), che rappresentano più del 95% dei linfociti T totali, oppure non associati a molecole HLA (CRγδ). Il processo di T delezione non riguarda solamente i cloni che riconoscono peptidi self presentati nella cavità apposita dalle molecole HLA, ma anche cellule T che interagiscono con superantigeni self congiuntamente con molecole HLA di classe II (v. capitolo 10). Il repertorio nei confronti dei peptidi non-self sarà altrettanto vasto che quello dei linfociti B, e come più volte sottolineato, riconoscerà generalmente il non-self peptidico nel contesto del self HLA. I linfociti T con specificità per le molecole HLA self di classe I saranno quelli con il marcatore CD8, e avranno attività citotossica o soppressiva. Quelli con specificità per le molecole HLA self di classe II saranno quelli con il marcatore CD4 e avranno attività helper-inducer (Strominger 1989; Teh e al. 1988; Fowlkes e al. 1988; Emmrich 1988; Marrack e Kappler 1988).

13. Il self e il non-self

Una difesa immunologica efficace e specifica contro qualunque microrganismo o altra struttura antigenica estranea, che salvaguardi le strutture autologhe (le alternative sarebbero o l'autoimmunità o il deficit immunitario) presuppone, come già detto, che le cellule effettrici debbano preliminarmente poter riconoscere e discriminare le strutture peptidiche autologhe (self) da quelle estranee (non-self).

Come ciò avvenga non è del tutto chiaro. Il problema, affrontato per la prima volta da Burnet con la teoria dei cloni proibiti e della selezione clonale, per quanto riguarda i linfociti B e la risposta anticorpale, è stato successivamente oggetto di numerosi studi sperimentali e di diverse ipotesi (teoria dell'aborto clonale di Nossal; teoria della rete idiotipica di Jerne) che si differenziano per il meccanismo col quale si raggiunge la self-tolleranza, ma hanno in comune la stessa concezione del self e del non-self. Self è l'insieme degli epitopi antigenici delle proteine autologhe. Queste non vengono attaccate da anticorpi specifici in quanto: 1) il repertorio dei linfociti B ha subito nel corso dell'ontogenesi la delezione fisica o funzionale delle cellule con IgM di membrana anti-self, oppure 2) i cloni B anti-self sono soppressi da una rete di anticorpi e/o di T linfociti anti-idiotipo, o non ricevono il segnale helper dai T linfociti $CD4^+$. In questa concezione, non-self è l'insieme dei determinanti antigenici delle proteine eterologhe.

Le acquisizioni derivate dalle scoperte del TCR, del ruolo biologico delle molecole HLA come molecole presentatrici di peptidi, e della restrizione MHC alla base del riconoscimento e della cooperazione cellulare, hanno portato a una diversa definizione del self e del non-self, come pure del meccanismo di selezione clonale delle cellule effettrici, non solo per le risposte da parte dei linfociti T, ma anche per le risposte T-dipendenti dei linfociti B che, come è noto, rappresentano la grande maggioranza delle risposte umorali. In base a queste acquisizioni sono stati riconosciuti due tipi di self, uno "immunologico " o self HLA, rappresentato dagli epitopi delle specificità HLA autologhe, che è stato definito una vera carta biologica d'identità individuale (Dausset e Contu 1980), e l'altro "somatico" o self peptidico, costituito dall'insieme degli epitopi immunogenici presenti nei peptidi delle proteine autologhe (Kourilsky e Claverie 1986).

Il self HLA è riconosciuto dai linfociti T insieme al non-self peptidico presentato dalla molecola HLA. Sulla base di alcuni esperimenti condotti prevalentemente nel topo e di varie osservazioni dimostrative della persistenza anche in soggetti sani di cloni T linfocitari dotati di reattività nei confronti di peptidi self, non necessariamente appartenenti a proteine "sequestrate", è stata introdotta una distinzione nell'ambito del self peptidico di due tipi distinti di self (self dominante e self criptico). Il self dominante è rappresentato dai siti immunogenici riconosciuti con alta affinità da specifici cloni T cellulari, mentre il self criptico è rappresentato dai siti immunogenici riconosciuti da cloni T con bassa affinità. I primi sono quelli che inducono tolleranza immunologica attraverso la delezione degli specifici cloni T a livello timico e post-timico.

I secondi viceversa non sono in grado normalmente di causare delezione dei cloni T

specifici, che restano pertanto come repertorio T cellulare capace in particolari circostanze di reazioni autologhe e di causare malattie autoimmuni. I meccanismi che portano a questo risultato sono differenti e riguardano:

1- la degradazione delle proteine (un sito immunogenico, anche dominante, può essere alterato nel corso della processazione e può perdere la sua immunogenicità consentendo la persistenza dei cloni T specifici;

2- la competizione tra peptidi, anche appartenenti alla stessa proteina nei confronti delle molecole HLA presentatrici, per cui un peptide può essere scarsamente presentato sulla superficie cellulare e un'altro può essere presentato in gran numero dalle molecole HLA;

3- la natura stessa del sito epitopico (molecole HSP);

4- la localizzazione in siti non accessibili ai linfociti T.

Il self peptidico dominante non è oggetto di riconoscimento da parte dei linfociti T, nè dunque di una loro reazione, in quanto come abbiamo già detto, i linfociti T dotati di TCR specifici per peptidi autologhi dominanti hanno subito una selezione negativa nel corso dell'ontogenesi. Il non-self HLA (caso di trapianti e di trasfusioni HLA incompatibili) è trattato come un non-self peptidico. Secondo altre concezioni bisogna distinguere dal self "somatico" un self "immunologico" rappresentato dagli idiopeptidi autologhi (cioè dai peptidi provenienti dagli idiotipi delle Ig e dei recettori TCR) presentati dalle molecole MHC. I linfociti T sarebbero tolleranti verso il self "somatico" in generale, ma potrebbero essere reattivi nei confronti dei peptidi degli idiotipi autologhi. Questo sarebbe alla base di un network di regolazione della risposta immune. E' stato anche suggerito che il self sia unicamente "somatico" e che le molecole HLA non siano riconosciute come self dai linfociti T (Kourilsky e al. 1987). In ogni caso, ad evitare confusioni, a noi sembra opportuno adottare per le strutture self le seguenti denominazioni:

1) self HLA o self MHC per le specificità HLA autologhe;

2) self idiopeptidico o self idiotipico per l'insieme dei siti immunogenici presenti nei peptidi degli idiotipi autologhi;

3) self peptidico per l'insieme dei siti immunogenici presenti nei peptidi autologhi esclusi gli idiopeptidi.

14. Riconoscimento del self e del non-self

Gli strumenti di riconoscimento specifico di cui dispongono le c. del sistema immunitario sono ben conosciuti, e sono stati già ricordati nelle pagine precedenti. Si tratta delle strutture recettoriali presenti sulla membrana dei linfociti T (TCR) e dei linfociti B (Ig.) alle quali sono dedicati appositi paragrafi (v. Parte seconda e terza. Arras e Contu 1992). Viceversa le modalità del riconoscimento, mentre appaiono sufficientemente chiare e ben definite per quanto riguarda i linfociti B e le Ig, presentano ancora qualche incertezza per quanto riguarda i linfociti T.

I linfociti B riconoscono siti antigenici di molecole estranee mediante specifici idiotipi delle Ig, attraverso un contatto diretto e senza restrizione HLA. Numerosi antigeni plurivalenti possono attivare direttamente i linfociti B senza il concorso dei linfociti T helper che però è necessario per ottenere una risposta anticorpale contro la maggior parte degli antigeni proteici (antigeni T-dipendenti).

I linfociti T possiedono recettori idiotipici TCR che riconoscono siti antigenici di peptidi estranei sulla superficie cellulare. Nella grande maggioranza dei linfociti T i TCR sono del tipo $\alpha\beta$ e riconoscono gli epitopi specifici in peptidi presentati da molecole HLA autologhe o della stessa specificità HLA (fenomeno della restrizione HLA). I peptidi presentati da molecole HLA di classe I sono riconosciuti da linfociti T-citotossici / soppressori che coesprimono insieme al complesso TCR-CD3 il marcatore CD8, mentre i peptidi presentati da molecole HLA di classe II sono riconosciuti da linfociti T helper-inducer che coesprimono col complesso TCR-CD3 il marcatore CD4. I peptidi presentati dalle molecole HLA ai TCR sono il risultato di una degradazione intracellulare di proteine estranee che può essere operata sia dai linfociti B che da cellule macrofagiche, come è stato già precisato (v. fig.1e e 3). Le stesse cellule presentano i prodotti di tale degradazione ai linfociti T per mezzo delle molecole HLA ed esattamente nella tasca dei peptidi di cui esse dispongono. Il meccanismo esatto del riconoscimento da parte del TCR è oggi abbastanza ben definito, anche se non tutti gli aspetti molecolari della restrizione HLA nel riconoscimento risultano completamente chiari.

In passato sono state formulate varie ipotesi sulla restrizione HLA del riconoscimento T cellulare.

1- Una prima ipotesi (meccanismo d'intimità) riteneva che il TCR riconoscesse esclusivamente un sito antigenico di una proteina, ma che ciò fosse condizionato da un contatto intimo tra molecole HLA del linfocita T e della cellula presentante il peptide, contatto che presupponeva un'identità (v. fig. 17A).

2- Una seconda ipotesi (meccanismo del doppio recettore) ammetteva che il linfocita T possedesse due recettori distinti denominati uno TCR1 con specificità per il self HLA, e l'altro TCR2 con specificità per l'antigene non-self presentato. I due riconoscimenti dovevano essere contestuali (v. fig. 17B).

3- Una terza ipotesi (meccanismo del singolo recettore o del riconoscimento in associazione) suggeriva che un solo recettore dovesse riconoscere un complesso forma-

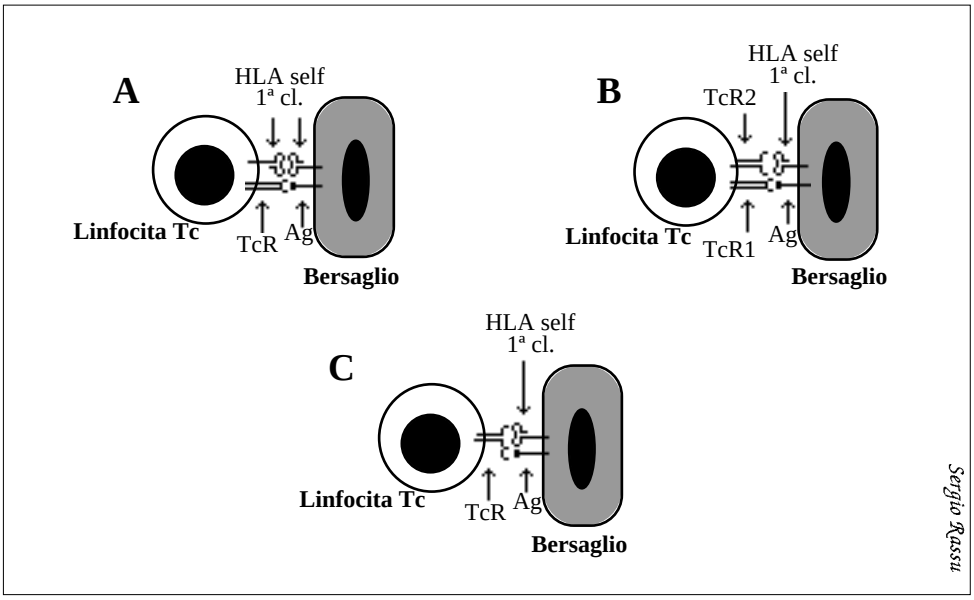


Figura 17. Modelli proposti per il riconoscimento dell'antigene da parte del linfocita T in restrizione HLA.
A-Ipotesi dell'intimità: riconoscimento dell'Ag estraneo da parte del TCR condizionato da un preliminare contatto "intimo" tra le molecole HLA, possibile solo, in caso di identità.
B- Ipotesi del doppio riconoscimento: riconoscimento contemporaneo dell'Ag estraneo e del self HLA mediante due distinti recettori denominati rispettivamente TcR1 e TcR2. (Queste due denominazioni che potrebbero creare confusione, devono essere distinte da quelle usate comunemente per indicare i due tipi di recettore dei linfociti T, rispettivamente MHC ristretto (TCRαβ o TCR-2) e MHC non ristretto (TCRγδ o TCR-1).
C- Ipotesi del riconoscimento in associazione: un solo recettore TCR dotato di due distinte superfici idiotipiche riconosce contestualmente l'Ag estraneo e il self HLA.

to dall'antigene non-self e dalla molecola HLA self. In questa ipotesi c'è un contatto diretto tra l'antigene e la molecola HLA. Questo può non comportare alcun cambiamento allosterico dei siti HLA riconosciuti dal TCR e quindi la molecola HLA è riconosciuta come self (v. fig.17C). Alternativamente il contatto tra l'antigene e la molecola HLA determina un cambiamento allosterico dei siti HLA esposti al TCR per cui la molecola HLA è riconosciuta come non-self (modello del self allogenizzato) (v. fig. 18A).

4- Un'ipotesi più recente di riconoscimento (modello del self peptidico) (Kourilsky e al. 1987) invoca un meccanismo diverso. Il recettore TCR riconosce unicamente il peptide non-self presentato dalla molecola HLA, ma non quest'ultima (v. fig. 18B). Il fenomeno della restrizione HLA si spiegherebbe col fatto che i peptidi presentati dalle

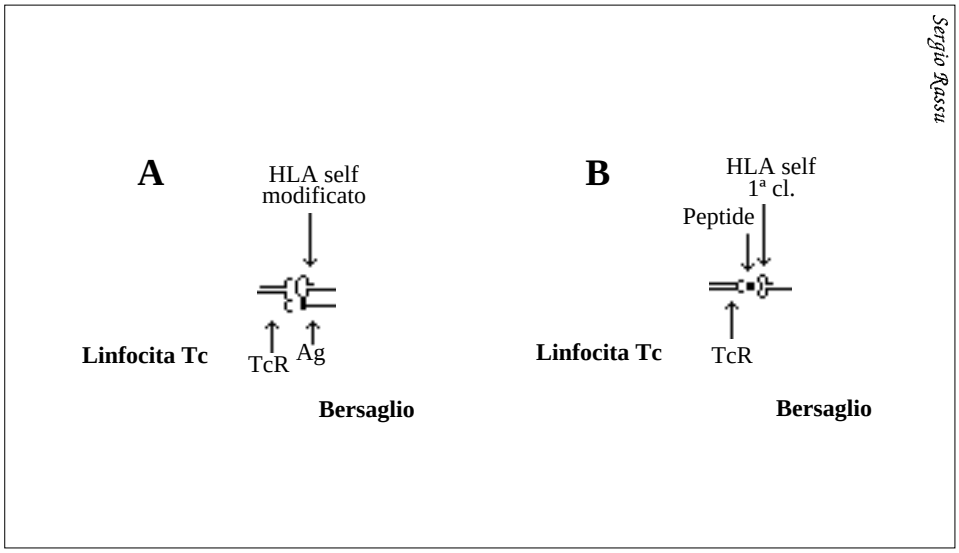


Figura 18. Gli altri modelli di riconoscimento dell'antigene da parte del linfocita T.
A- Ipotesi dell'allogenizzazione del self. Il self HLA è modificato dal contatto con l'antigene (allogenizzazione) ed è riconosciuto insieme all'antigene estraneo come struttura non self da un unico recettore TCR.
B- Ipotesi del ponte peptidico non self. L'antigene non self è presentato come peptide da una molecola HLA self, ed è riconosciuto da un TCR specifico che non interagisce con la molecola HLA . Il peptide è situato a ponte tra molecola HLA presentatrice e recettore TCR.

molecole HLA in un determinato individuo sono riconosciuti da cloni T specifici per i siti antigenici esposti in quelle condizioni di presentazione, cloni T che non potrebbero riconoscere gli stessi peptidi presentati da molecole HLA differenti in quanto i siti antigenici esposti in questo caso sarebbero differenti. La restrizione HLA in questa ipotesi risiederebbe dunque nella presentazione del peptide da parte della molecola HLA, ma non nel riconoscimento della molecola HLA da parte del TCR. Le cellule capaci di presentare antigeni estranei sarebbero ricoperte da una miriade di peptidi self nei confronti dei quali il sistema immunitario è tollerante. Ma la comparsa transitoria di peptidi non-self dopo l'acquisizione della tolleranza provoca la reazione di specifici cloni T.

5- L'ipotesi del riconoscimento contestuale dell'antigene non-self e della molecola HLA da parte di un singolo recettore TCR sembra più rispondente delle altre ai diversi dati sperimentali e, in modo particolare, al fatto che le proteine estranee sono riconosciute dai linfociti T come frammenti oligopeptidici, che il ruolo delle molecole HLA è quello di presentare tali peptidi, che ciò avviene mediante una apposita cavità situata nei domini esterni della molecola in prossimità dei siti responsabili delle specificità allotipiche

HLA (Bjorkman e al. 1987; Brown e al. 1988) (v. capitolo 9), che la conformazione della cavità è diversa in diverse molecole HLA e che pertanto uno stesso peptide potrà essere presentato in modo diverso da diverse molecole HLA, esponendo così differenti siti immunogenici ai linfociti T, e che infine i TCR riconoscono i peptidi solamente quando sono presentati da molecole HLA autologhe (v. fig. 19).

Questo modello è oggi accettato da tutti ed è supportato da evidenze dirette e indirette.

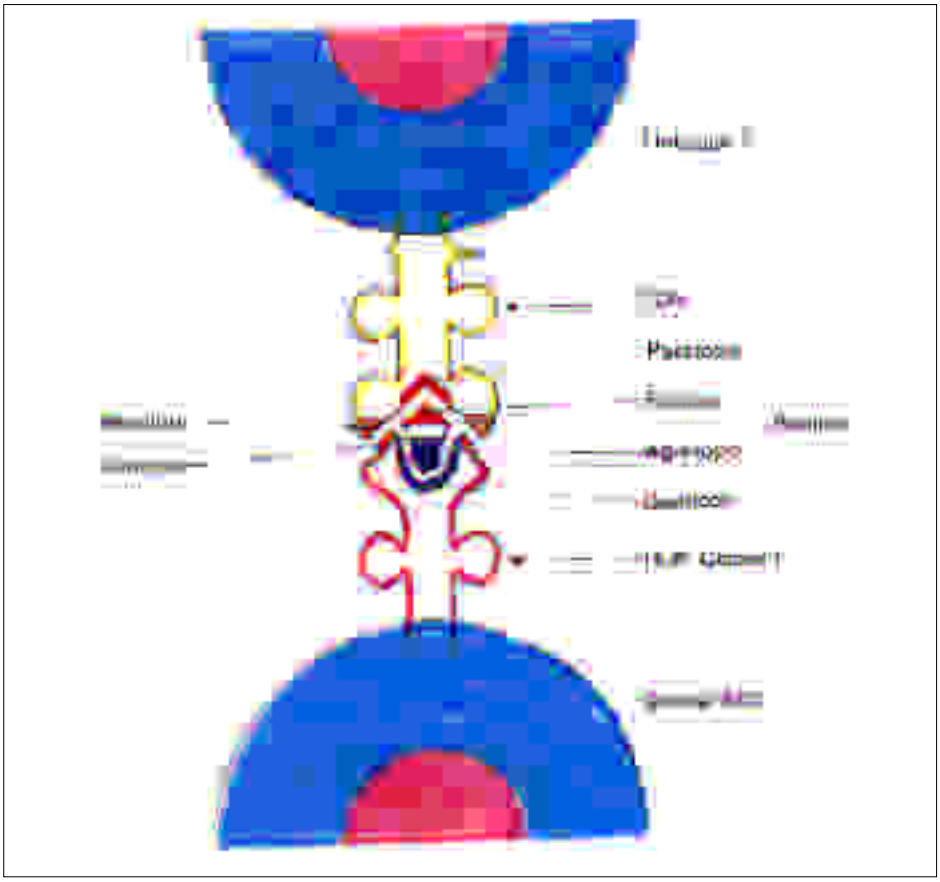


Figura 19. Riconoscimento del peptide da parte del linfocita T. Le superfici di contatto tra TCR, peptide e molecola HLA sono indicate da colori uguali: l'epitopo del peptide e il paratopo del TCR in rosso; l'agretopo del peptide e il desetopo della molecola HLA in violetto; l'istotopo della molecola HLA e il restitopo del TCR in marrone.

15. Memoria Immunologica

Nel vasto repertorio linfocitario periferico prodotto con la selezione clonale ciascun clone è predisposto per una specifica risposta nei confronti di un singolo antigene ed è composto in origine da un piccolo numero di cellule (1-1000 linfociti). In presenza dello specifico stimolo antigenico queste vanno incontro da una parte ad attivazione, avviando una risposta immunitaria primaria, e dall'altra a proliferazione, determinando un'espansione o amplificazione del clone. Nell'eventualità di una successiva stimolazione da parte dello stesso antigene, essendo notevolmente aumentato il numero di cellule che compongono il clone specifico, la risposta immunitaria (risposta secondaria) sarà molto più forte e più rapida. Questo fenomeno è conosciuto come "memoria immunologica" (v. anche i paragrafi 3.2, 4.3 e 5), e rappresenta uno degli aspetti più peculiari del sistema immunologico. Le cellule responsabili, sia B che T, sono cellule ricircolanti a lunga vita che, nel corso di un primo incontro con l'antigene specifico nei tessuti linfoidi periferici, sono andate incontro a importanti cambiamenti del fenotipo di membrana e più particolarmente, i linfociti B a switch isotipico da IgM a IgG o ad altri tipi di Ig, ed entrambi i linfociti ad incremento dell'affinità per l'antigene dei loro rispettivi idiotipi. Le caratteristiche fenotipiche e funzionali di queste cellule saranno precisate in paragrafi appositi nei capitoli dedicati ai linfociti T e ai linfociti B (Arras e Contu 1992).

16. Tolleranza e Modulazione Immunitaria

La mancata risposta dei linfociti B e/o T a determinati antigeni, e in particolare ad antigeni self, indipendentemente dal meccanismo e dalla fase della risposta che è coinvolta (fase cognitiva, afferente o efferente), è chiamata tolleranza immunologica. Gli antigeni che inducono tolleranza sono detti tolerogeni per distinguerli dagli immunogeni che causano risposte immuni. Normalmente gli antigeni self sono tolerogeni mentre gli antigeni non-self possono essere immunogeni o tolerogeni, a seconda della struttura molecolare, della dose e della via di somministrazione. La tolleranza è immunologicamente specifica e sempre dovuta a meccanismi operanti a livello somatico.

L'organizzazione clonale dei linfociti è alla base sia della tolleranza naturale, che riguarda gli antigeni self e che si instaura nel corso dell'ontogenesi linfocitaria, sia della tolleranza acquisita o indotta, che si sviluppa dopo che l'ontogenesi linfocitaria è completata, e che riguarda essenzialmente antigeni non-self.

La tolleranza immunologica nei confronti degli antigeni self è una proprietà fondamentale del sistema immunitario, e la sua perdita porta all'insorgenza di malattie autoimmuni. La T-tolleranza è particolarmente importante per la salvaguardia del self, in quanto: 1) le cellule T helper controllano sia le risposte immuni cellulari che umorali; 2) le cellule T possono essere rese tolleranti a concentrazioni molto basse di antigeni, quali si trovano in circolo per molti antigeni self.

La tolleranza naturale riconosce quattro meccanismi principali, e cioè, il sequestro o l'inaccessibilità degli antigeni; la delezione dei cloni linfocitari self reattivi; l'anergia clonale; la soppressione di linfociti self reattivi.

1- <u>Sequestro degli antigeni self.</u> Può essere di natura fisica o biologica. Alcuni antigeni self sono separati dal sistema immunitario da barriere anatomiche normalmente insuperabili. Così per esempio, le proteine delle cellule nervose, degli spermatozoi e del cristallino. Altri antigeni possono entrare a contatto col sistema immunitario solo in particolari circostanze, ma normalmente non sono raggiungibili da questo. Per esempio antigeni espressi sulla membrana delle cellule o liberati da queste solamente in condizioni patologiche. I cloni T e B con idiotipi specifici per gli antigeni self sequestrati o inaccessibili non vanno incontro alla generale selezione negativa dei cloni anti-self, e possono diventare responsabili di malattie autoimmuni. Nell'insieme il sequestro degli antigeni rappresenta un meccanismo di tolleranza immunologica di importanza modesta e di per sé insufficiente a garantire le strutture self dall'autoaggressione senza l'intervento di altri meccanismi di self tolleranza.

2- <u>Delezione clonale.</u> E' un meccanismo operante principalmente sui cloni T, ma, sia pure attraverso procedure molto diverse e non completamente chiarite, anche sui cloni B.

La delezione dei cloni T, sia helper che citotossici, si verifica essenzialmente durante la maturazione di queste cellule nel timo. Questo processo, già ricordato in paragrafi precedenti, opera su un repertorio di cloni T con TCRαβ tutti specifici per molecole HLA self, producendo l'eliminazione dei cloni T con TCRαβ specifici per peptidi self.

Schematicamente, i timociti immaturi sono $CD4^-CD8^-$ e non esprimono il TCR. Quando divengono timociti midollari acquisiscono in grande maggioranza il fenotipo $CD4^+CD8^+$ ed esprimono il TCRαβ a bassa concentrazione. E' in questo stadio della maturazione che avviene la selezione positiva consistente in: a) amplificazione dei cloni T HLA self specifici; b) delezione per apoptosi dei cloni T HLA non-self specifici; e c) perdita dell'antigene CD4 o CD8 con comparsa di linfociti a singola positività $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$. Successivamente le cellule T residue subiscono una selezione negativa con delezione dei cloni che riconoscono molecole HLA self presentanti peptidi self, e persistenza dei cloni T specifici per peptidi non-self presentati da molecole HLA self(v. anche capitolo 12).

La delezione dei cloni B self specifici può verificarsi quando le cellule B lasciano il midollo osseo e incontrano gli antigeni self prima di raggiungere la piena competenza funzionale, cioè nello stadio di sviluppo in cui esprimono solamente IgM e non ancora IgD. L'interazione con l'antigene specifico in questo stadio maturativo dà un segnale letale o inibitorio alle cellule B. Tuttavia non sembra che la delezione clonale rappresenti il meccanismo principale della self tolleranza B, come dimostra il fatto che in animali trattati con induttori policlonali B, come l'LPS, compaiono numerosi autoanticorpi differenti.

3- Anergia clonale. La stimolazione ottimale dei T $CD4^+$ necessita, oltrechè dell'interazione specifica tra TCRαβ e peptide presentato da una molecola HLA di classe II, anche di stimoli accessori forniti da mediatori prodotti dalla cellula APC, e complessivamente denominati "costimolatori". In assenza di questi, una cellula T che abbia interagito con lo specifico peptide continua a sopravvivere e ad esprimere recettori TCR specifici, ma non si amplifica e diviene non responsiva (anergia clonale) a successivi stimoli da parte dello stesso antigene presentato da cellule APC competenti come i macrofagi e i B linfociti. Questo avviene quando il peptide specifico è presentato per la prima volta al TCRαβ da molecole HLA di classe II espresse su cellule normalmente prive di funzione APC che non forniscono costimolatori. Questo è il meccanismo principale della selezione negativa dei linfociti T in fase extratimica che consiste in effetti in una delezione funzionale e non fisica come quella che avviene in sede timica. E' anche il meccanismo responsabile in gran parte della tolleranza che può essere indotta in vivo mediante somministrazione di grandi dosi di antigene.

La necessità di un doppio segnale è anche alla base dell'anergia clonale B per gli antigeni self. Se un linfocita B attraverso il legame con l'antigene specifico va incontro a cross-linking delle Ig, in assenza di un segnale costimolatorio prodotto da linfociti T helper (per esempio, interleuchine) diventa anergica, mentre in presenza dei due segnali va incontro ad attivazione.

4- Soppressione. Fenomeni di soppressione delle cellule T in alcune forme di tolleranza sono stati dimostrati sperimentalmente, ma i meccanismi su cui riposano non sono chiari. Essi sono verosimilmente gli stessi meccanismi di controllo e di modulazione della risposta immunitaria, che dipendono ancora dalla organizzazione clonale dei linfociti. Questi meccanismi sembrano consistere principalmente nell'attivazione di cloni T cellulari specifici, induttori della soppressione della risposta anticorpale (linfociti CD4+ che esprimono il marcatore CD29 o 4B4), e nel network idiotipico delle Ig, per

quanto riguarda la risposta umorale. Per quanto riguarda la risposta T linfocitaria sembrano invece essere in gioco: l'attivazione di cloni T cellulari soppressivi (linfociti $CD8^+$) efficaci soprattutto nel bloccare le risposte autoimmunitarie; la coespressione in linfociti T $CD8^+$ di markers che inviano alla cellula segnali accessori di non risposta, come è stato visto in timociti $CD8^+$ che coesprimono il CD1 (De la Hera e al. 1988); e nello sviluppo di reti idiotipiche dei TCR (v. fig.20).

Altri meccanismi, sono a disposizione del sistema immunitario per modulare la risposta immunologica e per ottenere la tolleranza nei confronti di determinati antigeni (v. paragrafo 10.2.). L'inefficienza dei meccanismi di controllo è spesso responsabile dello sviluppo di manifestazioni autoimmuni.

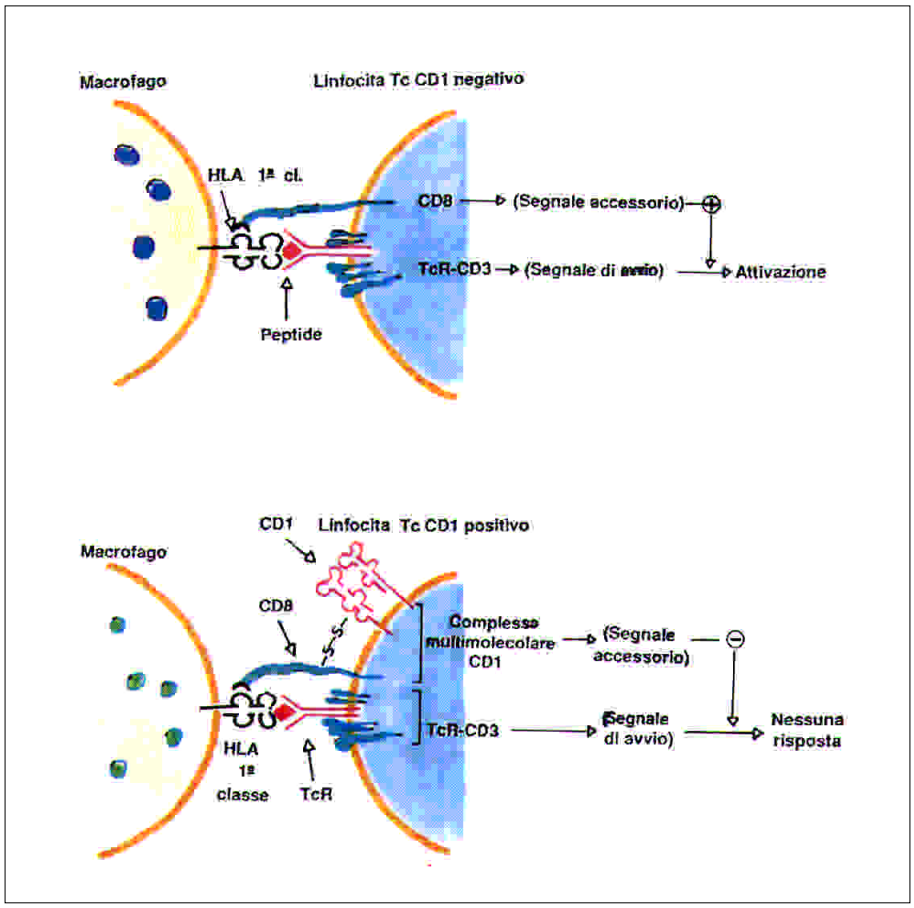


Figura 20. Influenza del CD1 sulla risposta delle cellule CD8 positive: la coespressione del CD1 in una cellula $CD8^+$ inibisce il segnale di attivazione trasmesso dal complesso TCR-CD3. Questo fenomeno riguarda generalmente i timociti $CD8^+$ e solo raramente i linfociti T $CD8^+$.

17. Cooperazione Cellulare e Risposta Immunitaria

La risposta immunitaria è il risultato di una serie di interazioni tra diversi tipi di cellule, le cui tappe principali sono le seguenti:

1) captazione della proteina estranea da parte di cellule capaci di internalizzarla, di processarla e di ripresentarla sotto forma di peptidi per mezzo delle molecole HLA di classe II. Questa tappa è effettuata essenzialmente da linfociti B e da macrofagi circolanti e residenti (v. fig.1, 3 e 4). La differenza essenziale fra i due casi consiste nel fatto che il linfocita B capta la proteina estranea per mezzo di una Ig specifica per uno dei suoi siti antigenici. Per conseguenza gli antigeni non-self saranno concentrati nei linfociti B in base alla loro specificità, e ogni linfocita B processerà proteine estranee relativamente omogenee, preliminarmente selezionate dalla specificità delle sue Ig.

Il risultato sarà, per ciascun linfocita B, una maggiore concentrazione di peptidi con siti antigenici specificamente riconosciuti dalle sue Ig.

Poiché l'immunoglobulina è internalizzata insieme alla proteina estranea da essa riconosciuta, l'epitopo a contatto con l'idiotipo della Ig è relativamente protetto nel processo di degradazione enzimatica operata sulla proteina estranea nel citoplasma. Conseguentemente la porzione della proteina sottoposta a processazione è quella non legata all'Ig. Pertanto i peptidi prodotti nella processazione avranno siti antigenici diversi da quello originariamente riconosciuto dall'Ig. Non è ancora chiaro se la parte captata dall'Ig viene sequestrata e non presentata oppure se viene presentata preferenzialmente. In entrambi i casi l'attività helper dei linfociti Th (T helper-inducer) che riconosceranno l'antigene presentato indurrà la produzione di anticorpi da parte del linfocita B (v. fig. 3).

Così la processazione della proteina riconosciuta da un linfocita B si tradurrà in una moltiplicazione dei siti antigenici presentati e quindi della probabilità di attivazione dei differenti linfociti Th, che a loro volta potranno indurre la produzione delle Ig che hanno inizialmente riconosciuto la proteina estranea. Questo si tradurrà in specificità ed efficienza della risposta cellulare e anticorpale nei confronti della proteina estranea (Abbas 1988; Manca e al. 1988).

2) interazione tra linfociti Th e cellule presentanti i peptidi (v. fig. 21).

Questo comporta: a) riconoscimento del peptide da parte del TCR del linfocita Th, con le modalità precedentemente esposte; b) attivazione del linfocita Th per trasduzione all'interno della cellula da parte della molecola CD4 del segnale prodotto dal contatto TCR-antigene; c) produzione da parte del macrofago di interleuchina 1 (IL-1); d) espressione nei linfociti T e B attivati di recettori per l'interleuchina 2 (IL-2); e) produzione di IL-2 da parte del linfocita Th .

3) cooperazione tra linfociti Th e linfociti B per la produzione di anticorpi. Avviene sia per mezzo di un ponte peptidico tra molecola HLA di classe II del linfocita B che presenta il peptide e molecola TCR specifica del linfocita Th che lo riconosce (v. fig. 3), secondo uno schema identico a quello dell'interazione tra linfocita Th e macrofago, sia

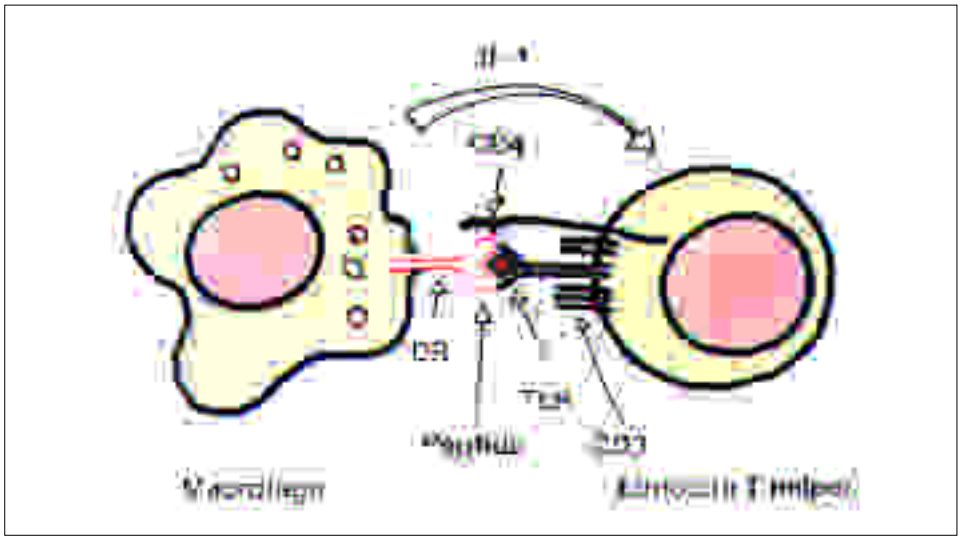


Figura 21. Presentazione del peptide al linfocita T helper da parte del macrofago con produzione di IL-1.

per l'intervento di linfochine (IL-2, IL-4 e IL-5) prodotte dal linfocita Th (Abbas 1988).

4) cooperazione tra linfociti Th e linfociti T-citotossici (Tc). E' una cooperazione indiretta: il linfocita Tc $CD8^+$, e $CD1^-$, è attivato in seguito al riconoscimento sulla cellula bersaglio del peptide estraneo presentato da una molecola HLA di classe I (v. fig. 22).

Il riconoscimento, come già detto, è realizzato per mezzo di specifici TCR in associazione con la molecola CD3. Il segnale di attivazione si traduce in un'espressione di recettori per IL-2 sulla membrana sui quali agisce la IL-2 prodotta dal linfocita Th, inducendo un'amplificazione del clone Tc attivato.

5) cooperazione tra linfociti T-soppressori (Ts) e linfociti Th o B. Benché non sia da tutti accettata l'esistenza di specifici linfociti Ts, si ritiene comunque che dei linfociti T con attività soppressiva siano responsabili del controllo dell'attività dei linfociti Th e dei linfociti B. La soppressione può essere antigene-specifica, idiotipo-specifica o non specifica, e le cellule responsabili sono denominate rispettivamente TsAg, TsId e TsAsp (Male e coll. 1988). La soppressione antigene-specifica è dovuta a un contatto tra cellula TsAg e cellula bersaglio (Th o B) mediato dall'antigene con conseguente liberazione di fattori di soppressione. E' di solito HLA ristretta. La soppressione idiotipo-specifica è dovuta a un legame diretto tra cellula TsId e cellula bersaglio. Questa, come quella aspecifica, non sembrano HLA ristrette. Non sappiamo se le cellule Ts utilizzano lo stesso tipo di recettore TCR delle altre cellule T. Lavori recenti sembrano tuttavia indicare che il riconoscimento dell'antigene da parte di alcuni linfociti Ts sia mediato da TCR-αβ (Modlin e coll. 1987). Perciò il meccanismo non è chiaro e resta per ora del tutto speculativo.

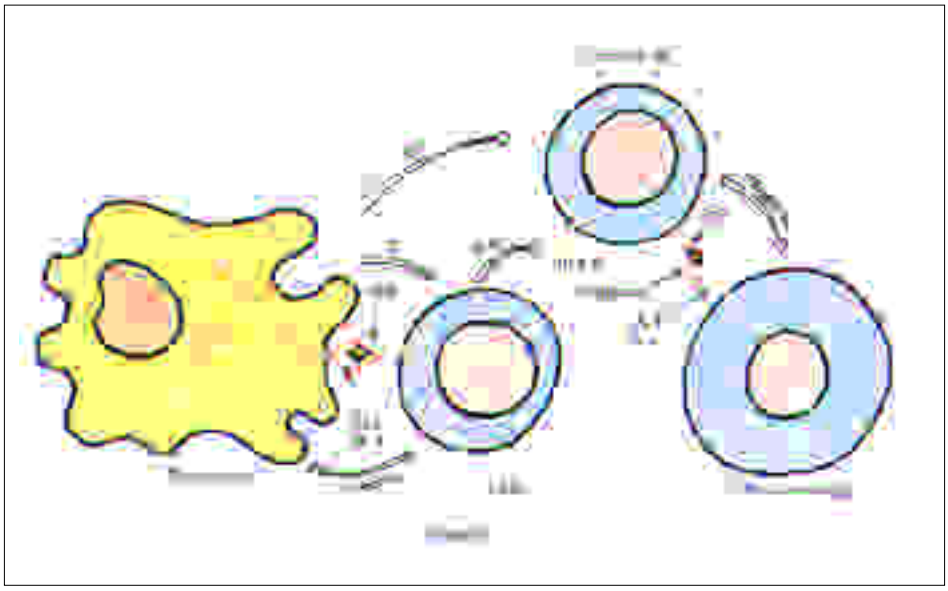


Figura 22. Cooperazione macrofago/linfocita Th/linfocita Tc. Il peptide presentato dal macrofago mediante una molecola HLA di classe II è riconosciuto dal TCR αβ del linfocita Th. Segue un'attivazione specifica del linfocita Th che induce per mezzo di mediatori l'attivazione del linfocita Tc. Questo riconosce sul bersaglio il peptide presentato da una molecola HLA di classe I e avvia il processo di citolisi mediante liberazione di perforine.

18. Le Strutture Funzionali della Membrana

Come è stato già sottolineato la risposta immunitaria è una funzione svolta essenzialmente dai linfociti che comporta tappe diversificate di riconoscimento dell'antigene, di attivazione e di amplificazione delle cellule preposte al riconoscimento e all'induzione delle risposte effettrici sia di tipo anticorpopoietico, che citotossico o soppressivo, e di attivazione e amplificazione delle cellule effettrici. Tutto questo è coordinato e finalizzato all'eliminazione del non-self nel rispetto dell'integrità del self, e presuppone cellule che a) abbiano raggiunto la maturità funzionale; b) siano in possesso di strumenti adeguati (recettori) per interagire con altre cellule (adesine) e per ricevere i segnali esterni provenienti da antigeni e da mediatori autologhi, come interleuchine, Ig, C3; c) dispongano di altri strumenti capaci di trasmettere i segnali esterni all'interno della cellula (trasduttori), d) siano in grado di rispondere a tali segnali con amplificazione, attivazione e/o differenziazione e corrispondente espressione in superficie e/o secrezione delle molecole effettrici (effettori). Tutte queste strutture indispensabili all'attività e alla vita sociale dei linfociti, sono teoricamente riconoscibili mediante anticorpi monoclonali (moAb) e attualmente disponiamo già di numerosi moAb che ci consentono di individuarli con precisione. Sono perciò comunemente denominate recettori, markers o antigeni di superficie, e sono appunto definiti dal fatto di essere riconosciuti da specifici moAb. Un linfocita in un determinato momento avrà dunque sulla membrana una serie di marcatori che ne esprimono: a) il tipo di differenziazione (linfociti T, B o NK), b) il livello di maturazione (CD71, CD38, CD1, CD3, CD4, CD8, IgM, IgD, IgG, CD20, CD21, CD35), c) il ruolo funzionale (CD4, CD8) e d) lo stato di attivazione (CD25, DR, CD57), che sarà possibile determinare mediante moAb con le moderne tecniche di citofluorimetria a flusso.

19. Le Popolazioni e Sottopopolazioni Linfocitarie

Per popolazione linfocitaria si deve intendere un insieme di linfociti tutti definiti dal possesso di un peculiare tipo di struttura di riconoscimento dell'antigene, che ne caratterizza il ruolo specifico nella risposta immunitaria. Le popolazioni linfocitarie sono pertanto: a) i linfociti T, definiti dalla presenza sulla membrana dell'eterodimero TCR, b) i linfociti B, definiti dalla presenza delle Ig, e c) i linfociti NK, definiti dalla presenza del NK-R o dall'assenza sia di TCR che di Ig. Lo studio dei marcatori di membrana permette di distinguere queste tre popolazioni cellulari anche in altro modo. Così la presenza del recettore delle emazie di pecora (CD2) ha storicamente definito i T linfociti prima ancora che fossero identificati i TCR, la presenza del marcatore CD19 distingue i linfociti B, e l'espressione dell'antigene CD16 identifica abbastanza bene le cellule NK. La definizione delle sottopopolazioni linfocitarie è meno precisa. L'espressione dovrebbe essere riservata a insiemi fenotipicamente e funzionalmente omogenei di linfociti appartenenti a una delle tre popolazioni principali. Così i linfociti T che esprimono il marcatore CD4, e svolgono la funzione di linfociti T-inducer, come pure quelli che esprimono il marcatore CD8 e hanno attività citotossica, configurano delle sottopopolazioni T linfocitarie. Ma, come verrà detto meglio nella Parte seconda e terza di questo lavoro, la corrispondenza tra fenotipo linfocitario e funzione non è sempre evidente. Linfociti T $CD4^+$ possono dimostrare attività soppressiva, e linfociti $CD8^+$ possono essere privi di attività citotossica. Poiché tuttavia la presenza di una combinazione di diversi marcatori di differenziazione, di maturazione, di attivazione non può che corrispondere a un determinato momento funzionale della cellula, benché questo non sia sempre esattamente attribuibile a quella cellula, sembra ragionevole definire le sottopopolazioni linfocitarie come insiemi e sottoinsiemi di linfociti T, B o NK con identica combinazione fenotipica di membrana e con simile atteggiamento funzionale. L'espressione di cluster di differenziazione, viene usata per definire un determinato marcatore di superficie identificato da un cluster di anticorpi monoclonali, e non un insieme di cellule con un determinato marcatore. Un'esposizione dettagliata delle popolazioni linfocitarie T, B e NK con i rispettivi marcatori di superficie è data nella Parte seconda e nella Parte terza di questo lavoro.

Bibliografia

1. Abbas A. K.: A reassesment of the mechanisms of antigen- specific T-cell-dependent B-cell activation. Immunol. Today, 9: 89-93, 1988

2. Arras M., Contu L.: Molecole di membrana e funzione immunologica. Parte seconda: I linfociti T e NK. Caleidoscopio. In corso di stampa.

3. Arras M., Contu L.: Molecole di membrana e funzione immunologica. Parte terza: I linfociti B e le cellule accessorie. Caleidoscopio. In corso di stampa.

4. Amiel J. L.: Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkins disease. In Curtoni E.S., Mattiuz P.J., Tosi R.M. (eds.) Histocompatibility Testing 1967, p.79, Munksgaard, Copenhagen 1967

5. Arnaout A.: Structure and function of the leucocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood, 75: 1037-1050, 1990

6. Ashwell J.D.: Commentary. Are B lymphocytes the principal antigen-presenting cells in vivo? J. Immunol., 140: 3697-3700, 1988

7. Bjorkman P. J., Saper M. A., Samraoni B., Bennet W. S., Strominger J. L., Wiley D. C.: The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature, 329: 512-518, 1987

8. Blue M. L., Craig K. A., Anderson K. A., Anderson P., Branton K. R. Jr., Schlossman S. F.: Evidence for specific association between class I major histocompatibility antigens and the CD8 molecules of human suppressor-cytotoxic cells. Cell, 54: 413-421, 1988

9. Brown J. H., Jardetzky T., Saper M. A., Samraoni B., Bjorkman P. J., Wiley D. C.: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. Nature, 332: 845-850, 1988

10. Craig E. A., Gross C. A.: Is hsp70 the cellular thermometer? T. I. B. S. 16: 135-138, 1991

11. Dausset J., Contu L.: Is the MHC a general self-recognition system playing a major unifying role in an organism? Human Immunol., 1: 5-17, 1980

12. Dausset J., Pla M.: HLA, complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris 1989

13. De Nagel D. C., Pierce S. K.: Heat shock proteins implicated in antigen processing and presentation. Immunol., 3: 65-70, 1991

14. Deverson E. V., Gow I. R., Coadwell W. J., Monaco J. J., Butcher G. W., Howard J. C.: MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. Nature 348: 738-741, 1990

15. Doyle C., Strominger J. L.: Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. Nature, 330: 256-259, 1987

16. Dustin M. L., Staunton D. E., Springer T. A.: Supergene families meet in the immune system. Immunol. Today; 9: 213-215, 1988

17. Dustin M. L., and Springer T. A.: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocytes adhesion to cultured endothelial cells. J. Cell Biol.; 107: 321-331, 1988

18. Emmrich F.: Cross-linking of CD4 and CD8 with the T-cell receptor complex: quaternary complex formation and T-cell repertoire selection. Immunol. Today, 9: 296-299, 1988

19. Flaherty L.: Major histocompatibility complex polymorphism: A nonimmune theory for selection. Human Immunol., 21: 3-13, 1988

20. Fowlkes B. J., Schwartz R. H., Pardol D. M.: Deletion of self- reactive tymocytes occurs at $CD4^{+}8^{+}$ precursor stage. Nature, 334: 620-623, 1988

21. Golstein P., Ojcius D. M., Young D. E.: Cell death mechanisms and the immune system. Immunol. Rev.,121: 29-65, 1991

22. Haas I. G.: Bip-a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 167: 71-76, 1991

23. Hackett C. J., Yewdell J. W., Bennink J. R., Sysocka M.: Class II endosomes or the cytosol with similar requirements for host protein transport but different kinetics of production. J. Immunol., 146: 2944-2951, 1991

24. Hill A. V. S., Allsopp C. E. M., Kwiatkowski D., Anstey N. M., Twumasi P., Rowe P. A., Bennett S., Brewster D., Mc Michael A. J., Greenwood B. M.: Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature, 352, 1991

25. Hynes R. O: Integrins: a family of cell surface receptors. Cell, 48: 549-554, 1987

26. Imberti L., Sottini A;, Bettinardi A., Primi D.: Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific receptor Vβ sequences. Science, 254: 798-800, 1991

27. 11Th International Histocompatibility Workshop Yokoama 1991

28. Jin Y., Shih J. W. K., Berkower I.: Human T cell response to the surface antigen of Hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenois antigen. J. Exp. Med. 168: 293-296, 1988

29. Kaufmann H. E.: Heat shock proteins and the immune response. Immunology Today, 11: 129-136, 1990

30. Kaufmann S. H. E.: Heat shock proteins in health and disease. Int. J. Clin. Lab. Res., 21: 221-226, 1992

31. Klein J.: Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. Human Immunol., 19: 155-162, 1987

32. Koopman G., Pals S. T.: Cellular interaction in the germinal center: role of adhesion receptors and significance for the pathogenesis of AIDS and malignant lymphoma. Immunol. Rev. 126: 21-45, 1992

33. Kourilski P., Claverie J.M.: The peptidic self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self . Ann. Immunol. Inst. Pasteur, 137 D : 3-21, 1986

34. Kourilski P., Chaouat G., Rabourdin-Combe C., Claverie J. M.: Working principles in the immune system implied by the “peptidic self” model. Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 3400-3404, 1987

35. Male D., Champion B., Cook A.: Immunologie: le systeme immunitaire et sa regulation. Medsi / Mc Graw-Hill, Paris, 1988

36. Manca F., Fenoglio D., Kunkl A., Cambiaggi C., Li Pira G., Celada F.: B cells on the podium: regulatory roles of surface and secreted immunoglobulins. Immunol. Today, 9: 300-303, 1988

37. Marrack P., Kappler J.: The T-cell repertoire for antigen and MHC. Immunol. Today, 9: 308-315, 1988

38. Modlin R. L., Brenner M. B., Krangel M. S., Duby A. D., Bloom B. R.: T cell receptor of human suppressor cells. Nature, 329: 541-544, 1987

39. Monaco J. J.: A molecular model of MHC class-I restricted antigen processing. Immunol. Today, 13: 173-179, 1992

40. Morrison D. C., and Ryan J. L.: Endotoxins and disease mechanisms. Annual Rev. Med., 38: 417-432, 1987

41. Neefjes J. J., and Ploegh H. L.: Intracellular transport of MHC class II molecules. Immunol. Today, 13: 179-184, 1992

42. Ortaldo J. R.: Human cytotoxic effector cells: definition and analysis of activity. Immunol. Clin., 7: 67-86, 1988

43. Perussia B., Trinchieri G., Jackson A., Warner N. L., Faust J., Rumpold H., Kraft D., Lanier L. L.: The Fc receptor for IgG human natural killer cells: phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. J. Immunol., 133: 180-189, 1984

44. Rothman J. E.: Polypeptide chain proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. Cell, 59: 591-595, 1989

45. Ruoslahti E., and Pierschbacher M. D.: Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. Cell, 44: 517-518, 1986

46. Seth R., Raymond F.D., Makgoba M.W.: Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospect for inflammatory and immune disorders. Lancet, 338: 83-84, 1991

47. Shaw S., and Luce G. E. G.: The lymphocytes function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. J. Immunol. 139: 1037-1045, 1987

48. Springer T. A.: Adhesion receptors of the immune sistem. Nature, 346: 425-434, 1990

49. Springer T. A., Dustin M. L., Kishimoto T. K., and Marlin S. D.: The lymphocytes function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of immune system. Ann. Rev. Immunol., 5: 223-252, 1987

50. Staunton D. E., Dustin M. L., and Springer T. A.: Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. Nature, 339: 61-64, 1989

51. Strominger J. L.: Developmental biology of the T cell receptor. Science, 244: 943-954, 1989

52. Teh H. S., Kisielow P., Scott B., Kishi H., Uematsu Y., Bluethmann H., Von Boehmer H;: Tymic major histocompatibility complex antigens and the αβ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. Nature, 335: 229-233, 1988

53. Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A.: Sequences

encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. Nature 348: 741-744, 1990

54. Unanue E. R.: Cellular studies on antigen presentation by class II MHC molecules. Curr. Op. Immunol., 4: 63-69, 1992

55. Van Buskirk A. M., Denagel D. C., Guagliardi L. E., Brdsky F. M., Pierce S. K.: Cellular and subcellular distribution of PBP 72/74, a peptide binding protein yhat plays a role in antigen processing. J. Immunol., 146: 500-506, 1991

56. Young J. D. E., Cohn Z. A.: Come agiscono le cellule "killer". Le Scienze, 235: 28-34, 1988

57. Young J. D. E., Lin C. C.: Multiple mechanisms of lymphocytes-mediated killing. Immunol. Today, 9: 140-144, 1988

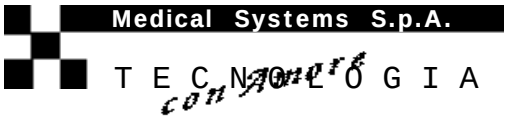
58. Young R. A.: Stress proteins and immunology. Annal Rev. Immunol., 8: 401-420, 1990

Indice

Editoriale.....pag. 3
Introduzione.....“ 5
Il Sistema Immunitario .....“ 7
1- Generalità .....“ 7
2- Immunità Specifica e Aspecifica .....“ 9
3- Le Cellule dell’Immunità .....“ 12
3.1. I Linfociti T .....“ 12
3.2. I Linfociti B .....“ 13
3.3. I Linfociti LGL.....“ 15
3.4. Le Cellule Fagocitarie .....“ 15
3.5. Le Cellule presentanti l’antigene o APC.....“ 16
4- Organi e Tessuti Linfoidi .....“ 17
4.1. Midollo osseo .....“ 17
4.2. Timo .....“ 17
4.3. Linfonodi .....“ 20
4.4. Milza.....“ 22
4.5. Altri tessuti linfoidi periferici .....“ 24
5- Homing e Traffico Linfocitario.....“ 25
6- Le Molecole di Adesione del Sistema Immunitario .....“ 27
6.1. La superfamiglia delle Ig .....“ 28
6.2. La famiglia delle Integrine .....“ 33
6.3. La famiglia delle Selectine .....“ 35
6.4. La famiglia delle H-CAM.....“ 36
7- Processazione, Trasporto e Presentazione
degli Antigeni .....“ 37
8- Le Proteine da Stress .....“ 39
8.1. Ruolo biologico delle HSP .....“ 39
8.2. Ruolo immunologico delle HSP.....“ 40
9- Il Sistema MHC.....“ 43
9.1. I geni HLA.....“ 43
9.2. Le molecole HLA.....“ 46
9.3. Ruolo delle molecole HLA.....“ 54
9.4. Polimorfismo HLA.....“ 55
9.5. HLA e malattie .....“ 56
10- Gli Induttori della Risposta Immune .....“ 60

10.1. Induttori policlonali ..... “ 60
10.2. Induttori oligoclonali (Superantigeni) ..... “ 61
10.3. Induttori monoclonali..... “ 63
11- I Meccanismi Effettori della Risposta Immune..... “ 65
11.1. Il Complemento ..... “ 65
12- Organizzazione Clonale del Sistema Immunitario ..... “ 70
13- Il Self e il non-self ..... “ 74
14- Riconoscimento del Self e del non-self..... “ 76
15- Memoria Immunologica..... “ 80
16- Tolleranza e Modulazione Immunitaria ..... “ 81
17- Cooperazione Cellulare e Risposta Immunitaria..... “ 84
18- Le Strutture Funzionali della Membrana ..... “ 87
19- Le Popolazioni e Sottopopolazioni Linfocitarie..... “ 88
Bibliografia ..... “ 89
Indice ..... “ 94

Volumi pubblicati nella Collana Caleidoscopio



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

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

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 10, numero 73

user
data-star
A service of RadioSuisse

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

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

European Association of Science Editors
EASE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta

Editore

TECNOLOGIA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola- Caleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed.,- Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

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

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

Finito di stampare: Settembre 1992
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

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

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

USPI

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

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