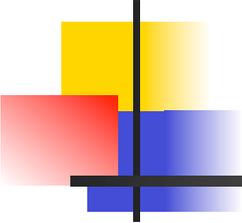
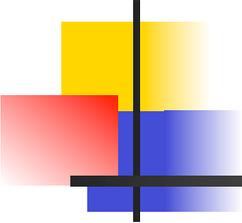


Regolazione della risposta immunitaria



Gli effetti delle risposte immunitarie

- **Effetti fisiologici (Benefici)**
 - Attivazione dell'immunità specifica per eliminare i patogeni infettanti (batteri, virus e tossine) senza conseguenze per l'individuo
- **Effetti patologici (Danni)**
 - Danno da risposte eccessive o incontrollate =
Ipersensibilità
 - Danno da risposte contro i propri tessuti =
Autoimmunità



Tolleranza immunologica: caratteristiche generali

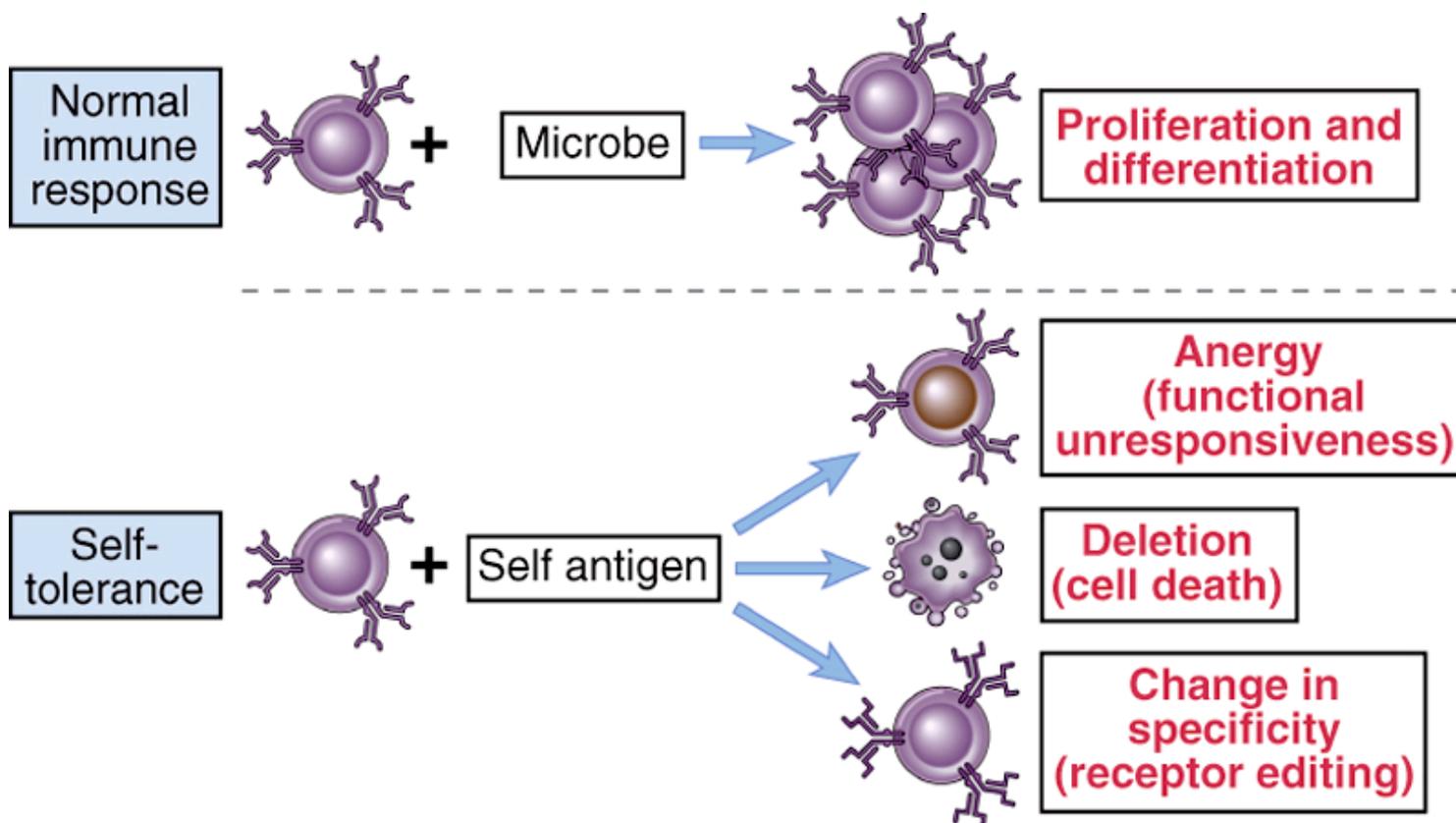
- **Linfocita + Antigene:**

- a) Risposta immunitaria (Ag immunogeno)
- b) Tolleranza (Ag tollerogeno)

- **Tolleranza al self:**

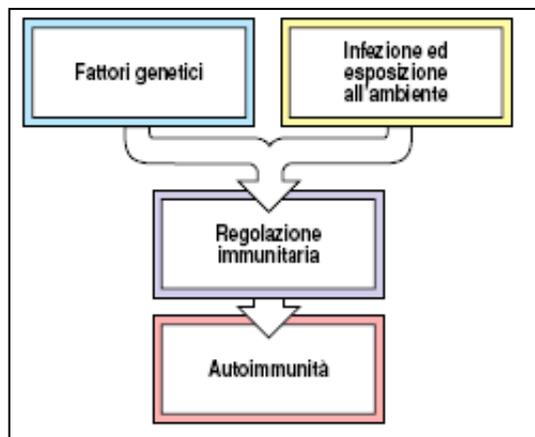
- Impedire o evitare la risposta immunitaria contro i propri antigeni
- Impedire l'autoimmunità bloccando la maturazione o l'attivazione dei linfociti auto-reattivi

Risposte fisiologiche agli antigeni



Autoimmunità

- Autoimmunità = Reazione immunitaria contro **antigeni self**
- L'autoimmunità deriva dalla mancanza o dall'alterazione della **tolleranza immunologica**
- Cellule responsabili: - Linfociti B
 - Linfociti T (CD4⁺ e/o CD8⁺)
- Fattori determinanti: - Predisposizione genetica
 - Fattori ambientali (infezioni)



La componente genetica nell'autoimmunità

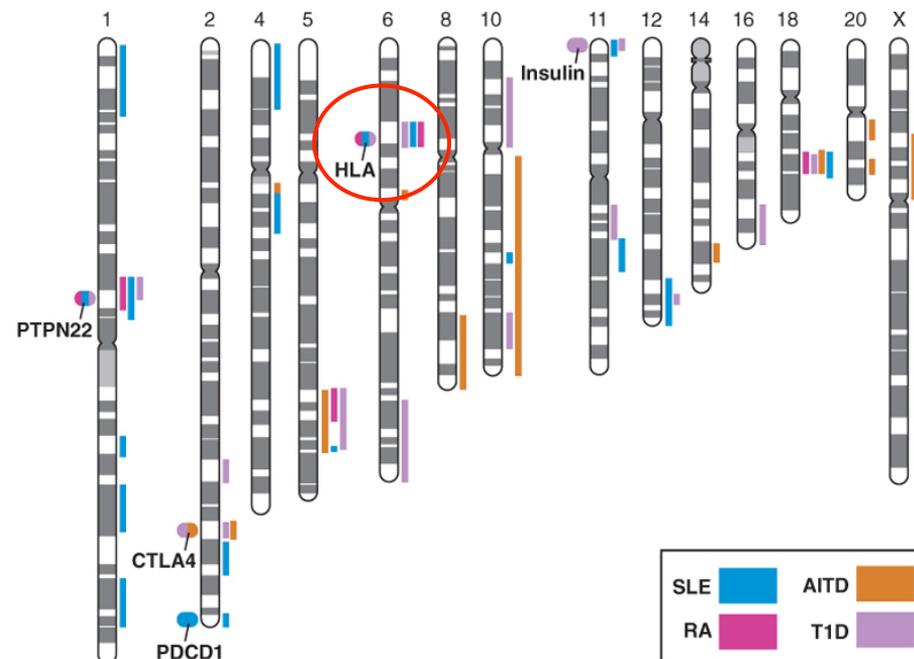
- La maggior parte delle malattie autoimmuni ha un contributo **poligenico** che determina la predisposizione
- L'associazione con i geni **MHC II** si presenta con alta frequenza

LES = lupus eritematoso sistemico

RA = artrite reumatoide

AITD = malattia autoimmune tiroide

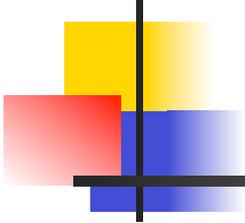
T1D = diabete tipo 1



Ruolo dei linfociti B e T nell'autoimmunità

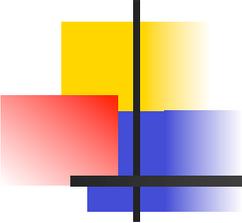
- Linfociti T CD4⁺: attivazione dei macrofagi
- Linfociti T CD8⁺: citolisi
- Linfociti B: autoanticorpi

Malattia	Linfociti T	Linfociti B	Anticorpi
Lupus eritematoso sistemico	Patogenici (CD4); Aiutano la risposta anticorpale	Secrezione anticorpi	Patogenici
Diabete tipo 1	Patogenici (CD4 e CD8)	Presentano l'antigene ai linfociti T	Presenti; Ruolo non chiaro
Miastenia grave	Aiutano la risposta anticorpale	Secrezione anticorpi	Patogenici
Sclerosi multipla	Patogenici (CD4)	Presentano l'antigene ai linfociti T	Presenti; Ruolo non chiaro



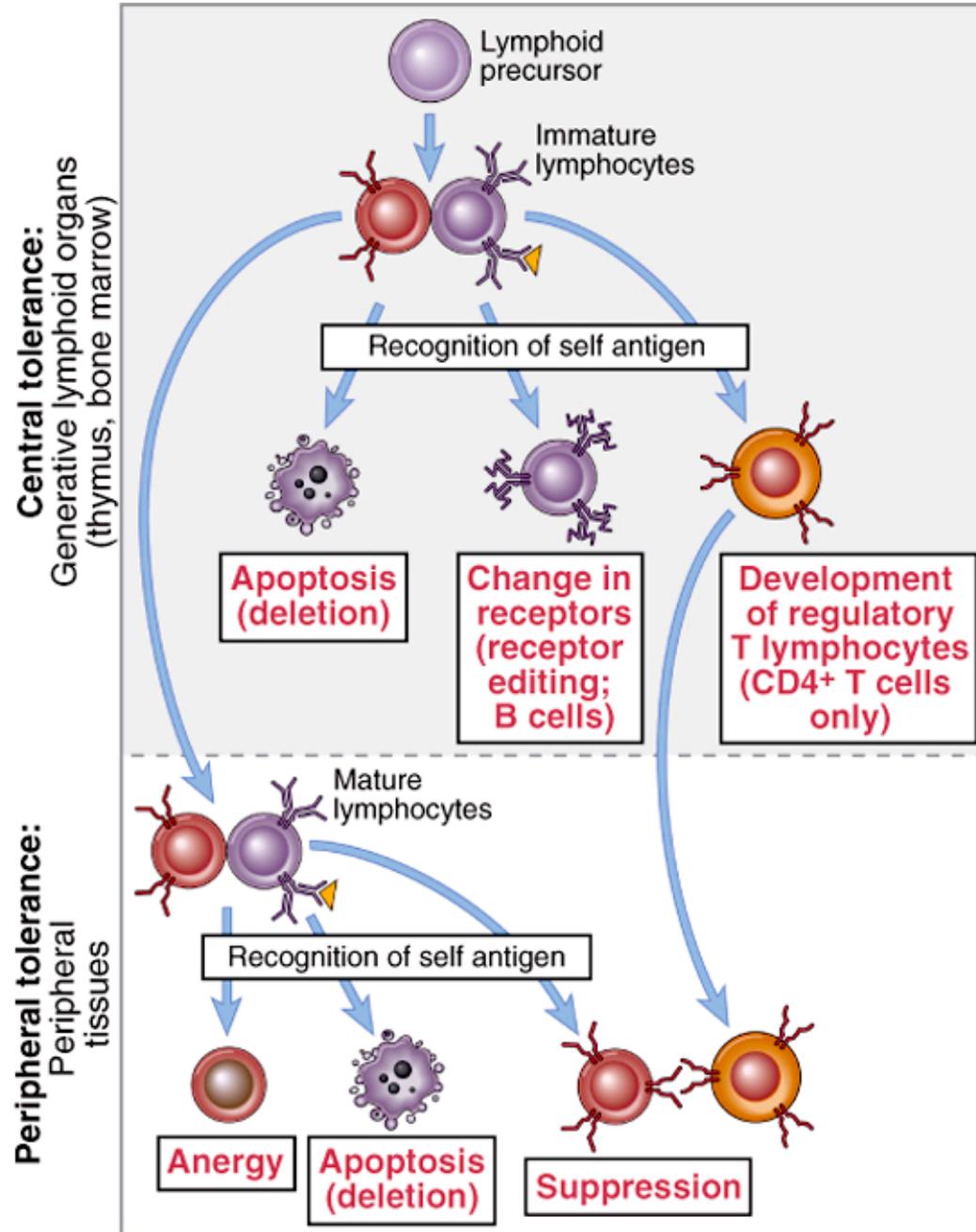
I diversi livelli di tolleranza al self

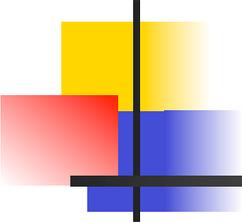
Tipo di tolleranza	Meccanismo	Sito di azione
Tolleranza centrale	-Delezione -Editing BCR	-Timo -Midollo osseo
Segregazione dell'antigene	Barriera fisica all'accesso di autoantigeni nel sistema linfoide	Organi periferici (tiroide, pancreas)
Anergia periferica	Inattivazione mediante segnale debole senza co-stimolo	Organi linfoidi secondari
Linfociti T regolatori	Soppressione mediata da citochine	Organi linfoidi secondari e siti d'infiammazione
Deviazione citochinica	Differenziamento verso T_H2 , per limitare le citochine infiammatorie	Organi linfoidi secondari e siti d'infiammazione
Esaurimento clonale	Apoptosi al termine dell'attivazione	Organi linfoidi secondari e siti d'infiammazione



Tolleranza centrale e periferica

- La tolleranza **centrale** seleziona i **linfociti immaturi** negli organi linfoidi primari
- La tolleranza **periferica** controlla i **linfociti maturi** nei tessuti periferici
- Alcuni linfociti **CD4⁺ autoreattivi** si differenziano in **linfociti T regolatori**



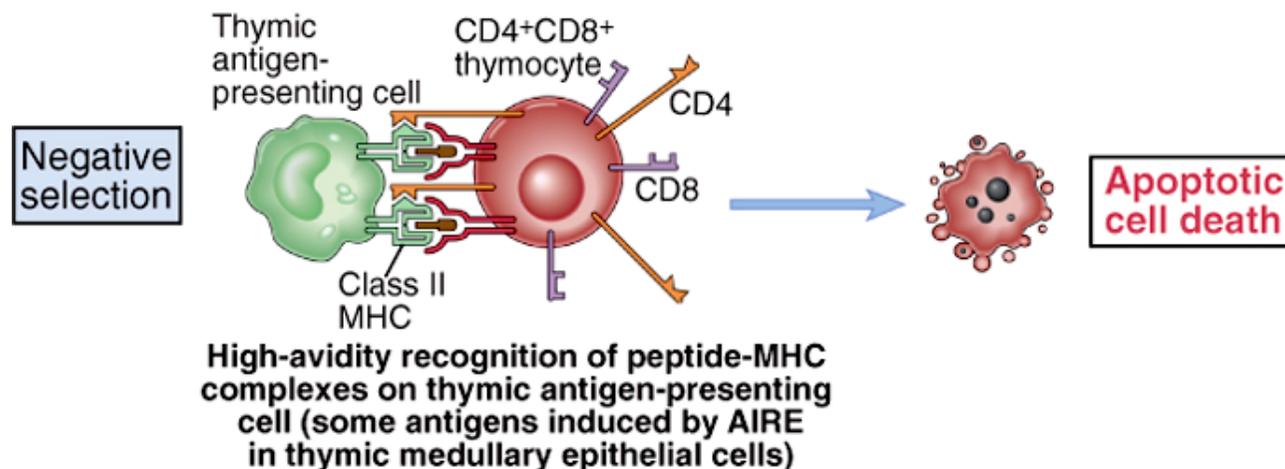


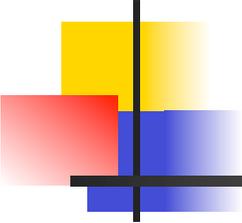
Caratteristiche della tolleranza centrale

- La tolleranza centrale si instaura a seguito della **selezione negativa** nel timo e nel midollo osseo
- In questi organi i linfociti possono incontrare **solo una parte** degli antigeni self:
 - antigeni dei tessuti linfoidei primari
 - antigeni ubiquitari (in comune tra tutti i tessuti)
 - alcuni antigeni tessuto-specifici (tramite AIRE nel timo)
- Riconoscimento self alta affinità → Forte segnale del recettore linfocitario → Delezione tramite apoptosi

Tolleranza centrale dei linfociti T

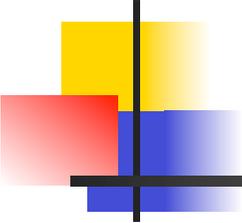
- La delezione dei timociti autoreattivi dipende dal riconoscimento dei peptidi self presentati dalle APC timiche
- Fattori critici: - Concentrazione Ag self nel timo
- Affinità del TCR





Ruolo delle proteina AIRE nella tolleranza centrale

- AIRE = Autoimmune Regulator
- Fattore di trascrizione delle cellule epiteliali timiche
- Regola l'espressione di antigeni tessuto-specifici
- Mutazioni nel gene *AIRE* causano la Sindrome Poliendocrina Autoimmune (APS)
- Danno agli organi endocrini:
 - Ghiandole paratiroidi
 - Ghiandole surrenali
 - Isole pancreatiche

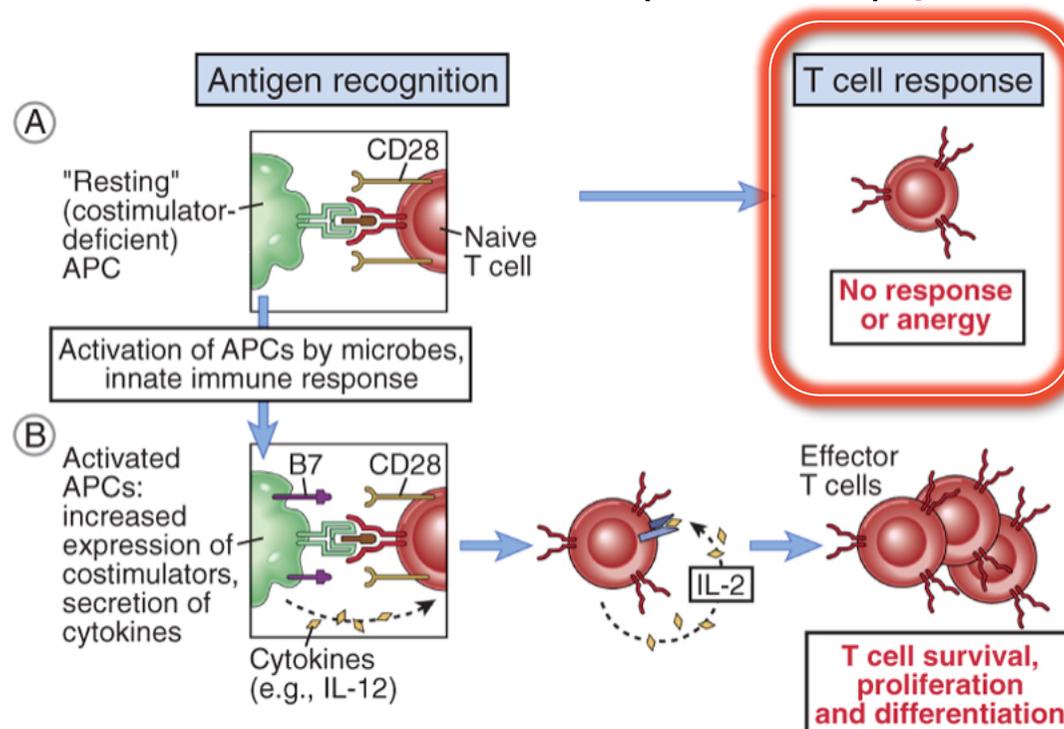


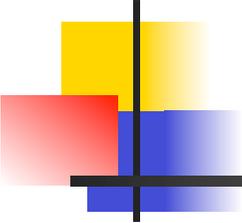
Tolleranza periferica dei linfociti T

- La tolleranza centrale controlla solo una parte della risposta agli antigeni self
- La tolleranza periferica controlla la risposta agli antigeni espressi nei vari tessuti dell'organismo
- Meccanismi periferici:
 - Anergia
 - Apoptosi
 - Linfociti T regolatori

Meccanismi della tolleranza periferica: Anergia

- Anergia = Nessuna risposta ad un determinato Ag
Segnale 1 \Rightarrow Interazione TCR-Ag-MHC
Segnale 2 \Rightarrow Interazione CD28 (linfocita)-proteine B7 (APC)





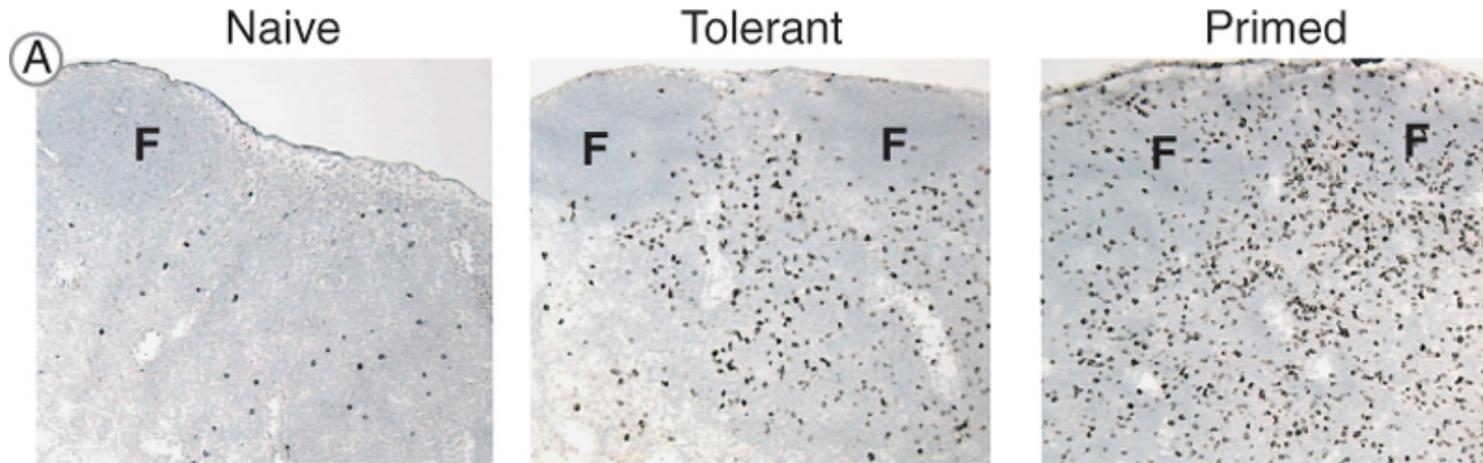
Induzione dell'anergia con antigeni solubili

- Condizione **immunogena**: Ag non self + **adiuvante**
- Condizione **tollerogena**: Ag non self (dose elevata) senza adiuvante

Modello Sperimentale:

- a) Linfociti T prelevati da animale transgenico (A) per un TCR specifico verso un determinato Ag (X)
- b) Trasferimento dei linfociti (A) in animali normali (B)
- c) Antigene specifico (X) per il TCR (A) somministrato agli animali (B) in modalità **immunogenica** o **tollerogena**

Analisi *in vivo*: linfonodi dei topi (B) marcati per evidenziare i linfociti (A) con il TCR specifico per l'antigene (X)

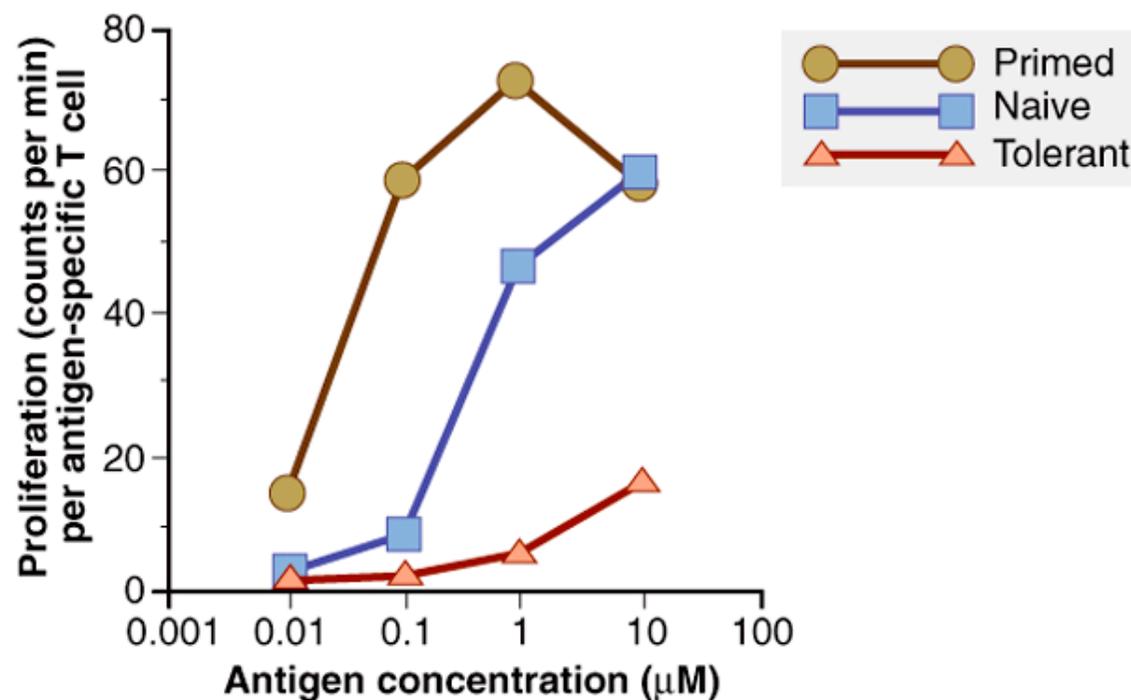


I topi non trattati contengono poche cellule naïve: nessuna nei Follicoli linfoidi

I topi trattati con dosi elevate di Ag senza adiuvante mostrano **leggera proliferazione** ma **non penetrano** nei Follicoli

I topi trattati con l'Ag e l'adiuvante mostrano **forte proliferazione** e **penetrano** nei Follicoli

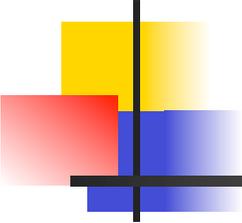
Analisi *in vitro*: i linfociti vengono prelevati dai topi (B) e stimolati con l'antigene (X) specifico per i linfociti con il TCR (A)



I linfociti naïve dei topi non trattati rispondono all'antigene e proliferano

I linfociti dei topi trattati in condizioni immunogeniche proliferano con grande efficienza

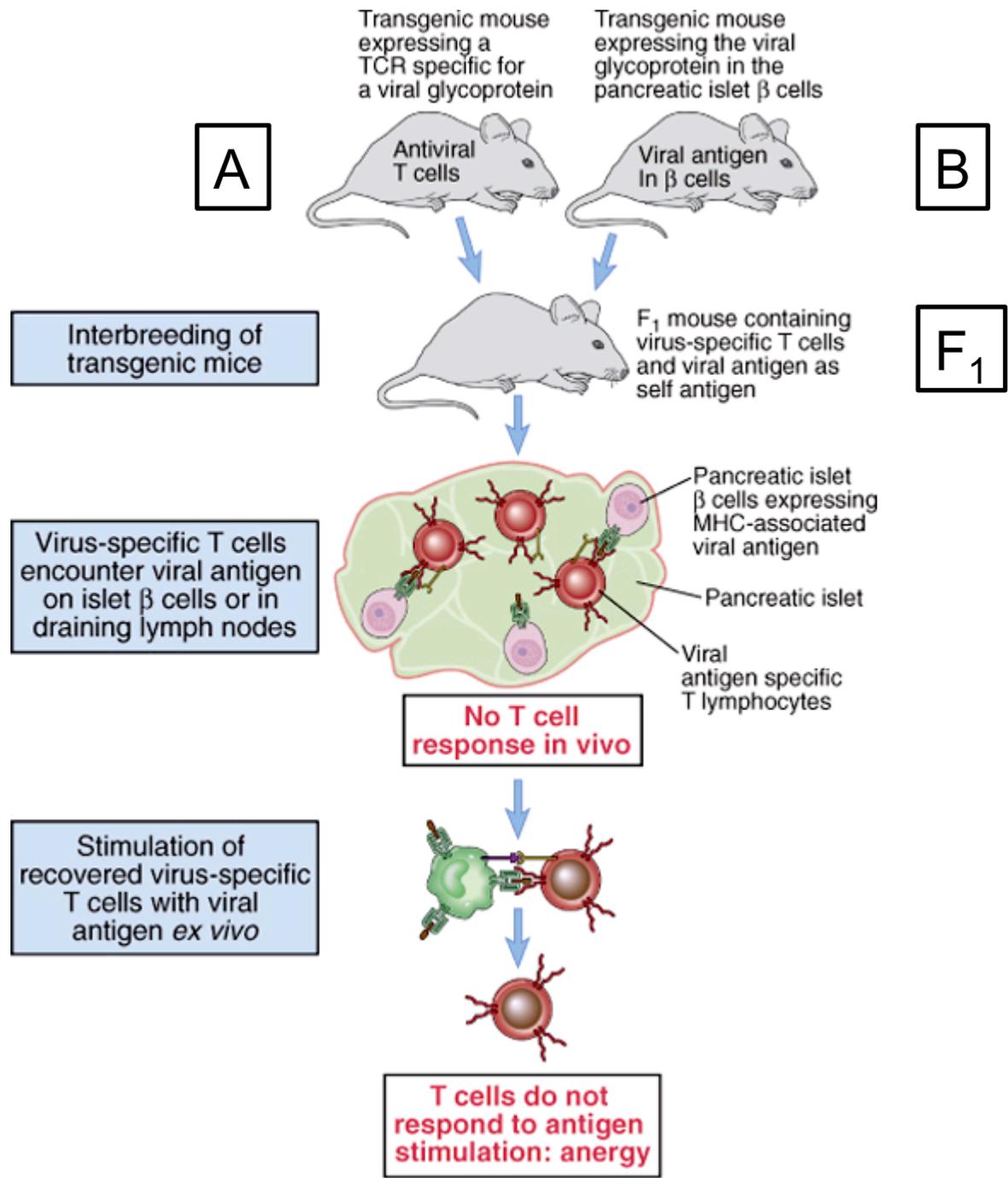
I linfociti dei topi trattati in condizioni tollerogeniche hanno un blocco della proliferazione



Induzione dell'anergia con antigeni self

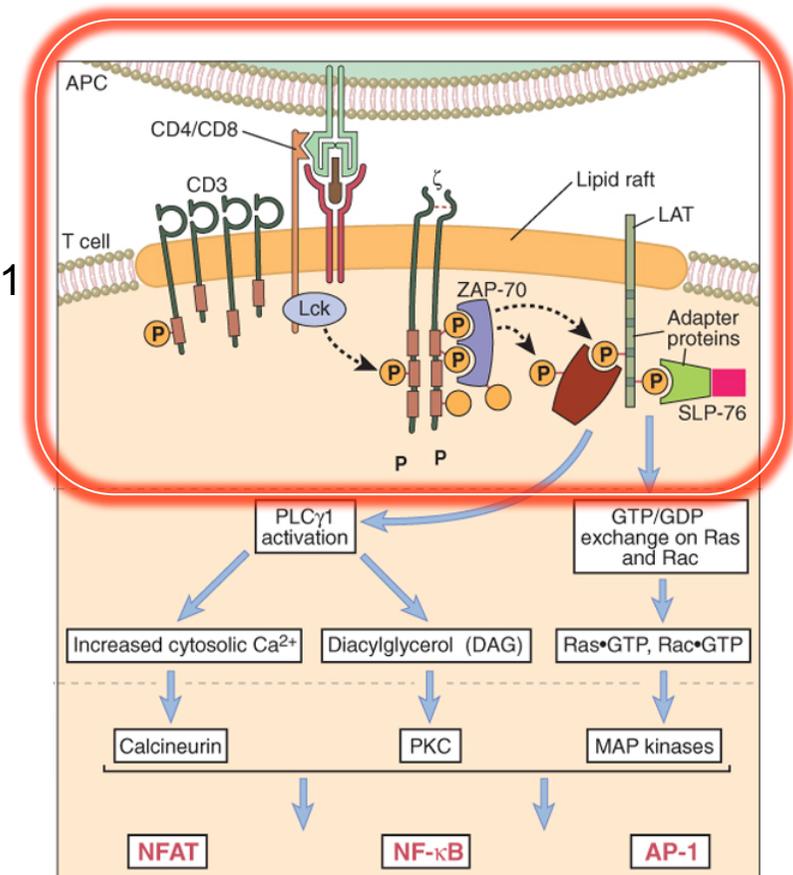
Modello Sperimentale:

- a) Animale transgenico (A) per una proteina **non self** (X) espressa in modo **tessuto-specifico**
 - b) **Incrocio** dell'animale transgenico (A) con un'altro animale transgenico (B) per un **TCR specifico** verso la proteina (X)
 - c) **L'animale F₁** che deriva dall'incrocio sviluppa **tolleranza periferica** nei confronti della proteina (X)
-
- Condizione **tollerogena**: la proteina (X) diventa un **antigene self** che viene presentato dalle APC in **assenza di molecole costimolatorie**



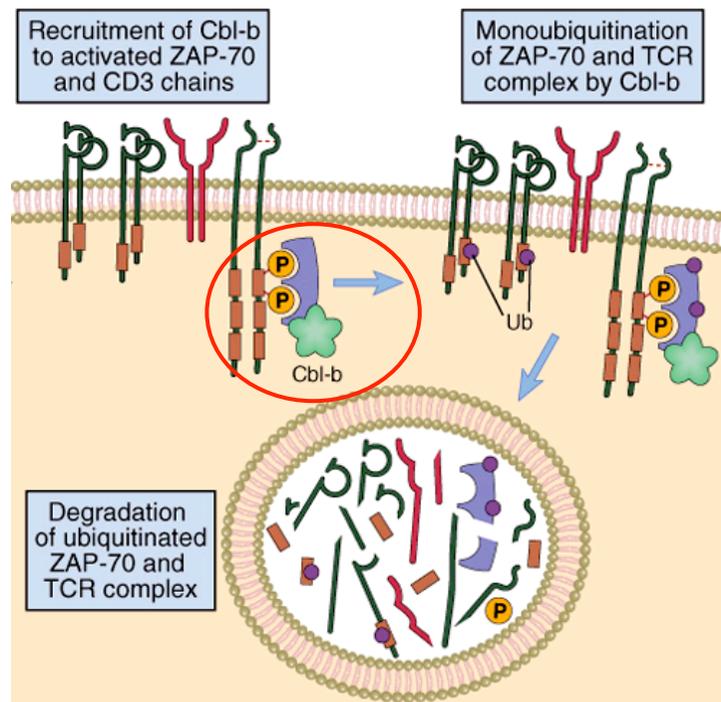
Anergia e segnali del TCR

- Il processo di anergia si instaura modulando l'attivazione dei segnali biochimici del TCR
- **Inibizione Lck e ZAP-70** → Tirosin-fosfatasi (SHP-1)
- **Blocco costimolazione CD28** → Recettore CTLA-4 e PD-1
- **Degradazione complesso TCR** → Ubiquitin-ligasi (Cbl-b)



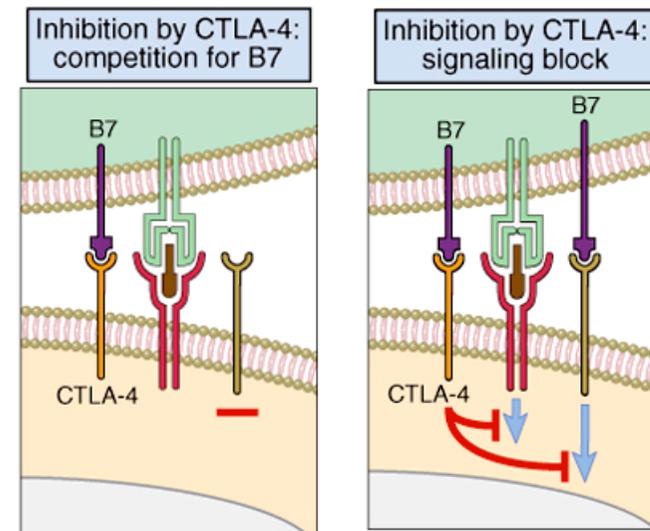
Anergia e Autoimmunità

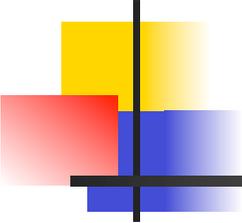
- L'importanza dei geni che controllano l'anergia è dimostrata dai modelli sperimentali
- Topi KO **Cbl-b**: proliferazione spontanea T, autoimmunità.



Anergia e Autoimmunità

- L'importanza dei geni che controllano l'anergia è dimostrata dai modelli sperimentali
- Topi KO **CTLA-4**: eccessiva attivazione linfociti, aumento dimensioni linfonodi e milza, infiltrato linfocitario diffuso.
- Topi KO **PD-1**: autoimmunità diffusa (nefrite lupica, artrite e cardiomiopatia autoimmune).



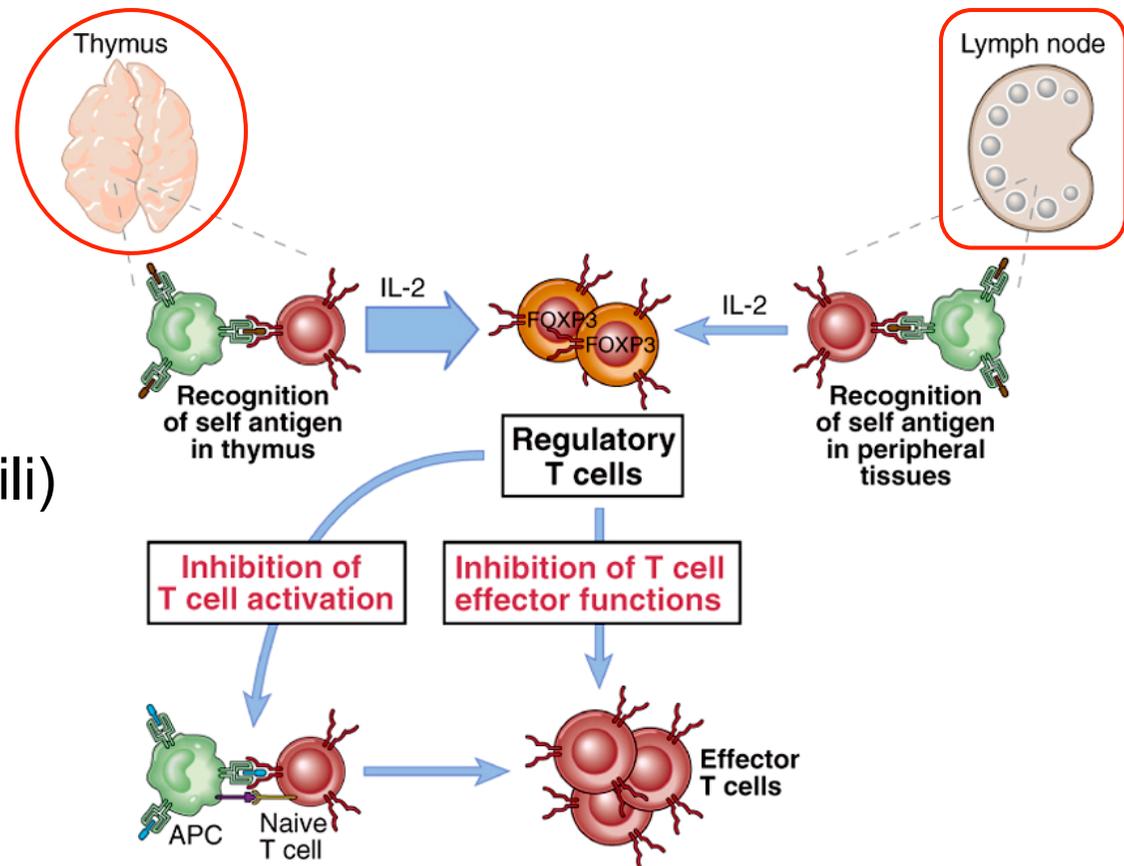


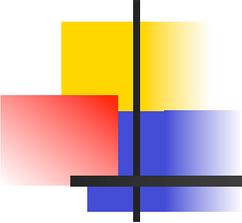
Linfociti T regolatori

- Linfociti T regolatori (Treg) = sottopopolazione CD4⁺
 - Espressione costitutiva CD25 (catena α IL-2R)
 - Fattori critici per sviluppo e sopravvivenza
 - ✓ TCR specifico per Ag self
 - ✓ Citochine: IL-2 e TGF- β
 - ✓ Fattori di trascrizione: FoxP3
- **Azione immunosoppressiva: secrezione citochine IL-10 e TGF- β**

Sviluppo delle Treg

- Le cellule T regolatorie possono generare:
 - Nel timo (Treg naturali)
 - Nei linfonodi (Treg inducibili)



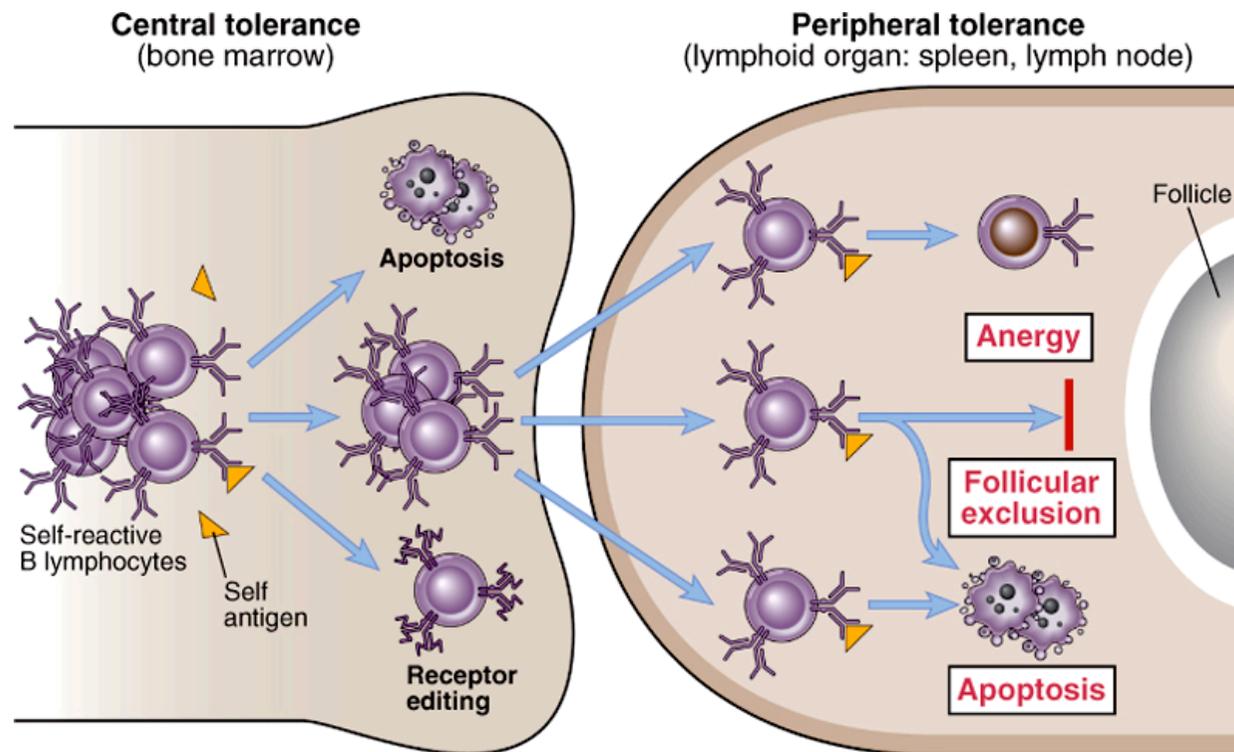


Linfociti Treg e Autoimmunità

- Topi KO **IL-2** o **IL-2R α (CD25)** : nessuno sviluppo Treg; infiammazione intestinale, anemia emolitica autoimmune e autoanticorpi.
- Topi KO oppure mutati per **foxp3**: assenza Treg; sindrome autoimmune multisistemica.
- Nell'uomo le mutazioni del gene **FOXP3** sono responsabili della malattia autoimmune IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome).

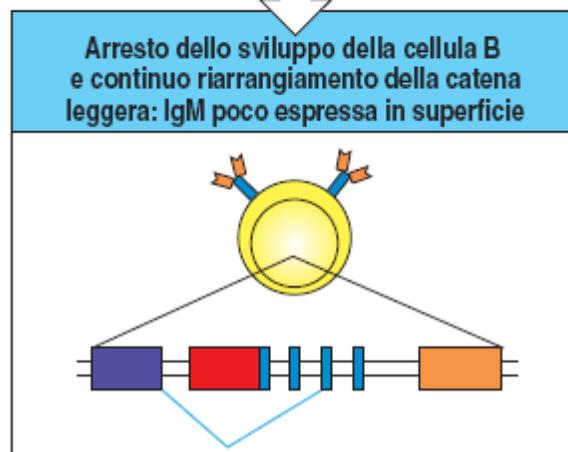
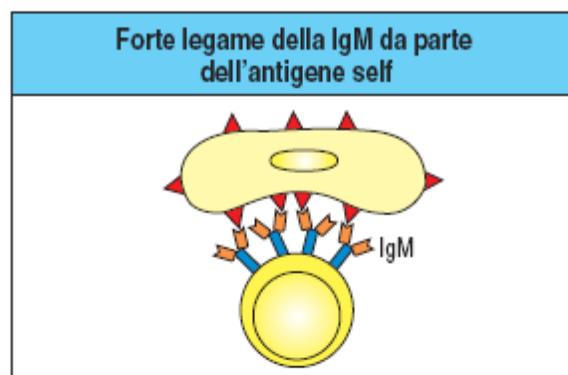
Tolleranza dei linfociti B

- Tolleranza **centrale**: Cambio specificità recettoriale, Apoptosi
- Tolleranza **periferica**: Anergia, Esclusione follicolare, Apoptosi

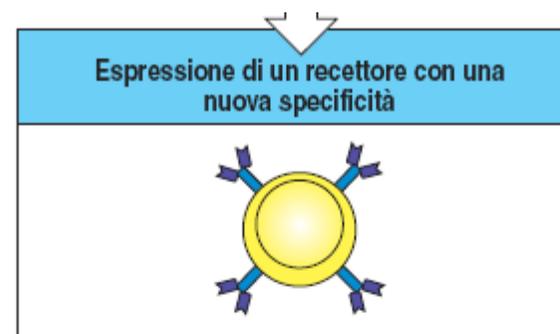


Tolleranza centrale dei linfociti B

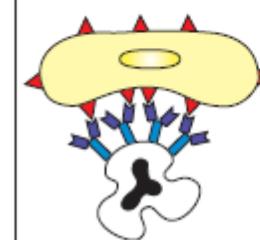
Prima selezione



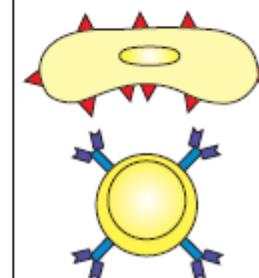
Seconda selezione

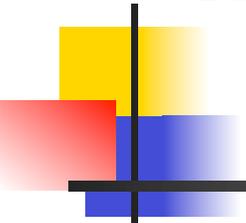


Se anche il nuovo recettore risulta autoreattivo, il linfocita si avvia all'apoptosi



Se il nuovo recettore non risulta autoreattivo, il linfocita migra verso la periferia e matura

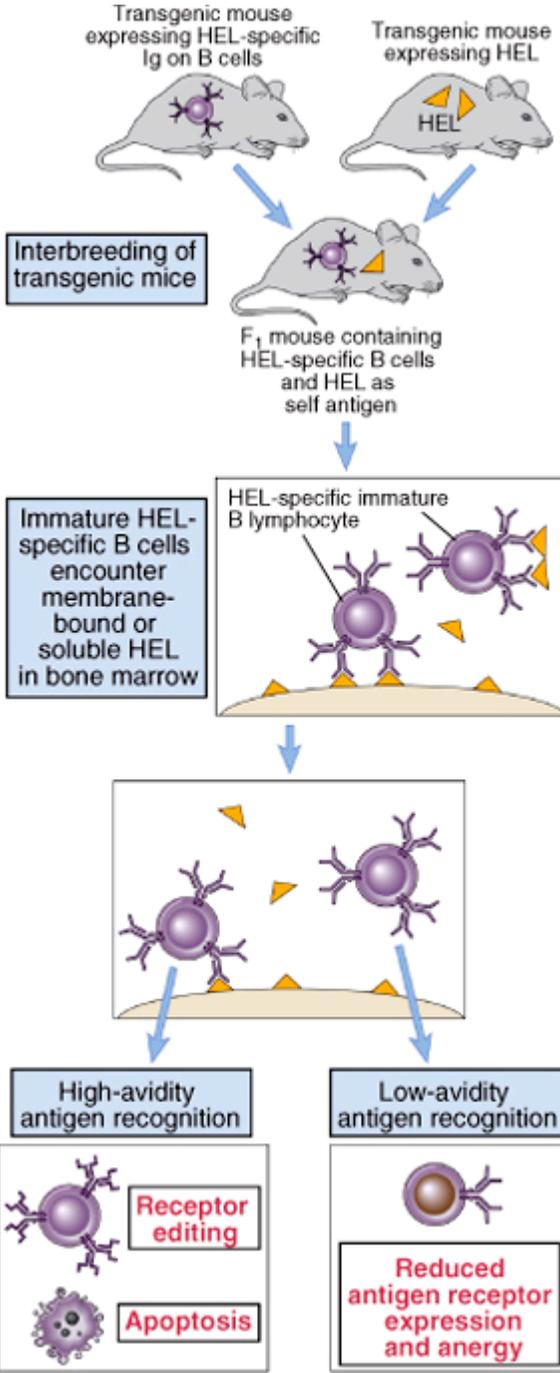


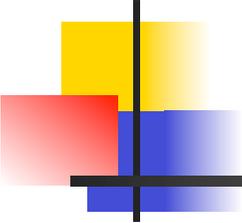


Induzione della tolleranza B con antigeni self

Modello Sperimentale:

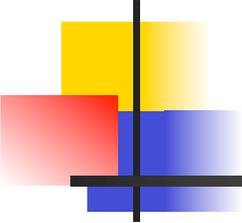
- a) Animale transgenico (A) per una proteina **non self** (X) espressa in modo **tessuto-specifico**
 - b) **Incrocio** dell'animale transgenico (A) con un'altro animale transgenico (B) per una **Ig specifica** verso la proteina (X)
 - c) **L'animale F₁** che deriva dall'incrocio sviluppa **tolleranza centrale** nei confronti della proteina (X)
-
- Condizione **tollerogena**: la proteina (X) diventa un antigene self che determina la selezione dei linfociti B immaturi non reattivi.





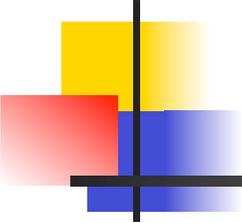
Tolleranza periferica dei linfociti B

- I linfociti B maturi **autoreattivi** vengono inattivati o eliminati quando sono **assenti linfociti T_H specifici** per l'Ag
- Meccanismi periferici:
 - Anergia
 - Apoptosi
 - Esclusione follicolare



Fattori coinvolti nella tolleranza periferica B

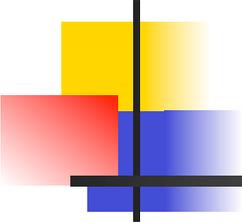
- Esposizione cronica all'Ag → Riduzione recettore CXCR5 → Blocco ingresso nei follicoli
- Esclusione follicolare → Assenza segnali sopravvivenza → Apoptosi
- Linfocita B anergico + Linfocita T_H → Interazione Fas (cellula B) / FasL (cellula T) → Apoptosi



Modulazione farmacologica

- Rottura della tolleranza = Risposte immunitarie dannose
- Problemi → Ipersensibilità, Infiammazione, Autoimmunità
- Soluzioni → Immunosoppressione

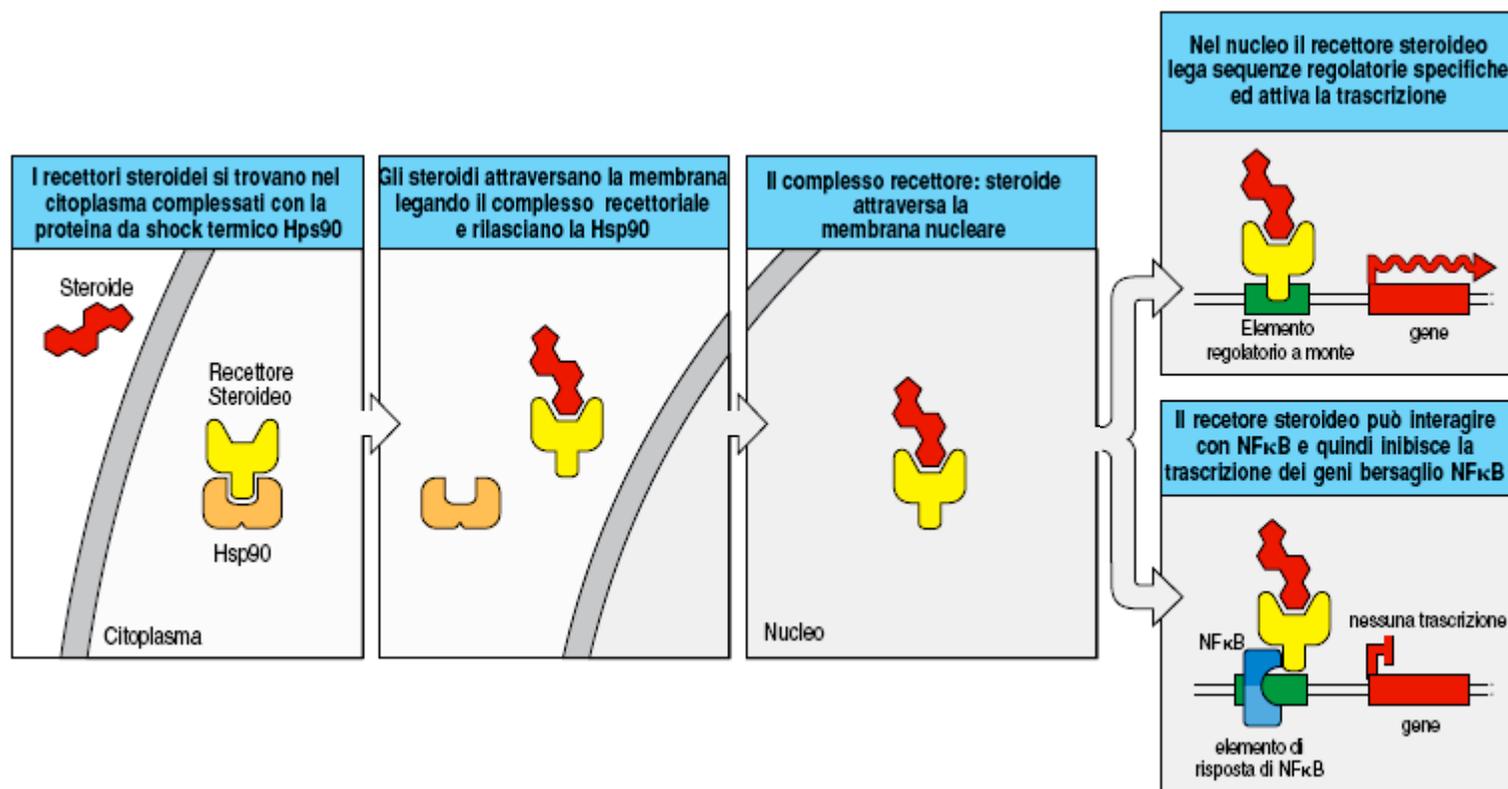
- Categorie farmaci immunosoppressivi:
 - Immunosoppressori antiinfiammatori (corticosteroidi)
 - Immunosoppressori citotossici (ciclofosfamide)
 - Immunosoppressori cellule T (CsA, FK506, etc.)



Corticosteroidi

- Ormoni steroidei della famiglia dei glucocorticoidi
- Prednisone = analogo sintetico del cortisolo
- Meccanismo d'azione: alterazione dell'espressione genica (positiva o negativa)
- Vantaggi terapeutici: blocco dell'infiammazione
- Effetti avversi:
 - Ritenzione idrica
 - Aumento di peso
 - Diabete
 - Perdita calcio osseo

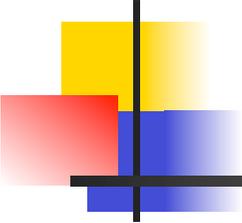
Meccanismo d'azione dei corticosteroidi



Geni bersaglio dei corticosteroidi

- Citochine proinfiammatorie
- Enzimi proinfiammatori
- Molecole di adesione

Terapia corticosteroidea	
Espressione genica	Effetti
↓ IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL,5	↓ Infiammazione indotta da citochine
↓ Ossido Nitrico Sintasi (NOS)	↓ Ossido Nitrico (NO)
↓ Fosfolipasi A2 ↓ Ciclossigenasi 2 ↑ Annexina-1	↓ Prostaglandine, Leucotrieni
↓ Molecole di adesione	Ridotta migrazione dei leucociti nei vasi
↑ Endonucleasi	Apoptosi di linfociti ed eosinofili

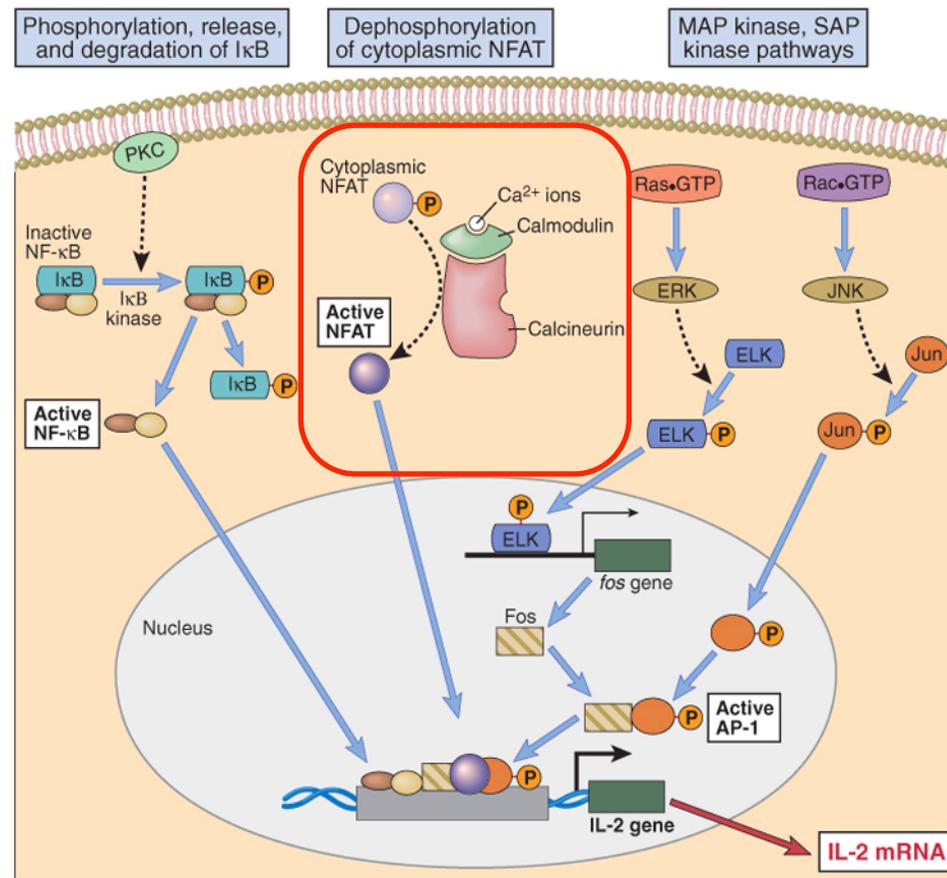


Immunosoppressori T-specifici

- Sostanze derivate da funghi e batteri:
 - **Ciclosporina A** = decapeptide ciclico fungino
 - **FK506 (tacrolimus)** = macrolide batterico
 - **Rapamicina (sirolimus)** = macrolide batterico
- Meccanismo d'azione: blocco del segnale TCR → blocco della proliferazione T

Meccanismo d'azione della CsA e del tacrolimus

- Inibizione della fosfatasi **calcineurina**



La ciclosporina (CsA) lega la ciclofilina (CyP)

Il tacrolimus (FK506) lega una immunofilina della famiglia FKBP



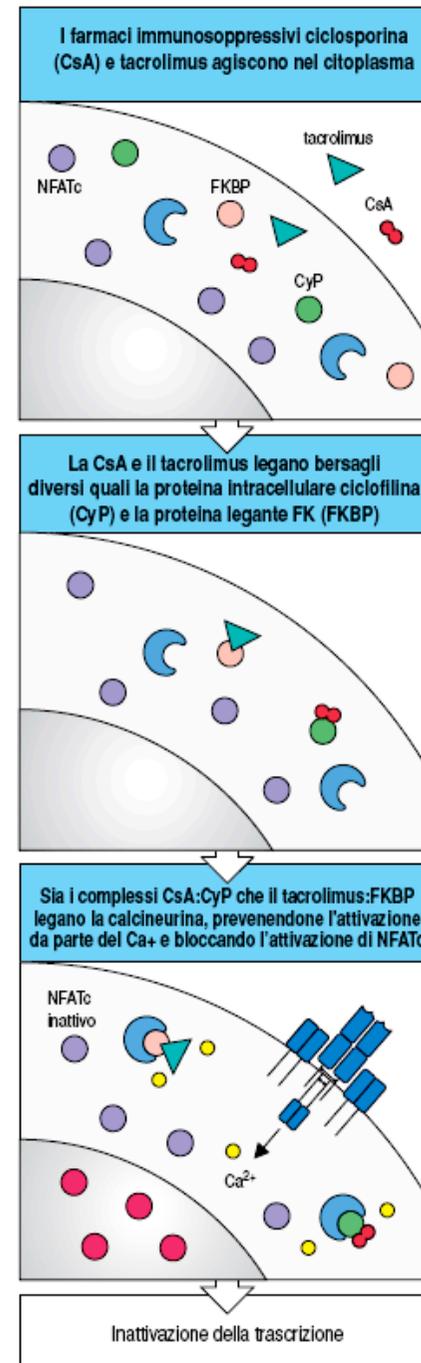
I complessi formati legano la calcineurina



Il fattore trascrizionale NFAT resta inattivo dopo l'attivazione del segnale che parte dal TCR

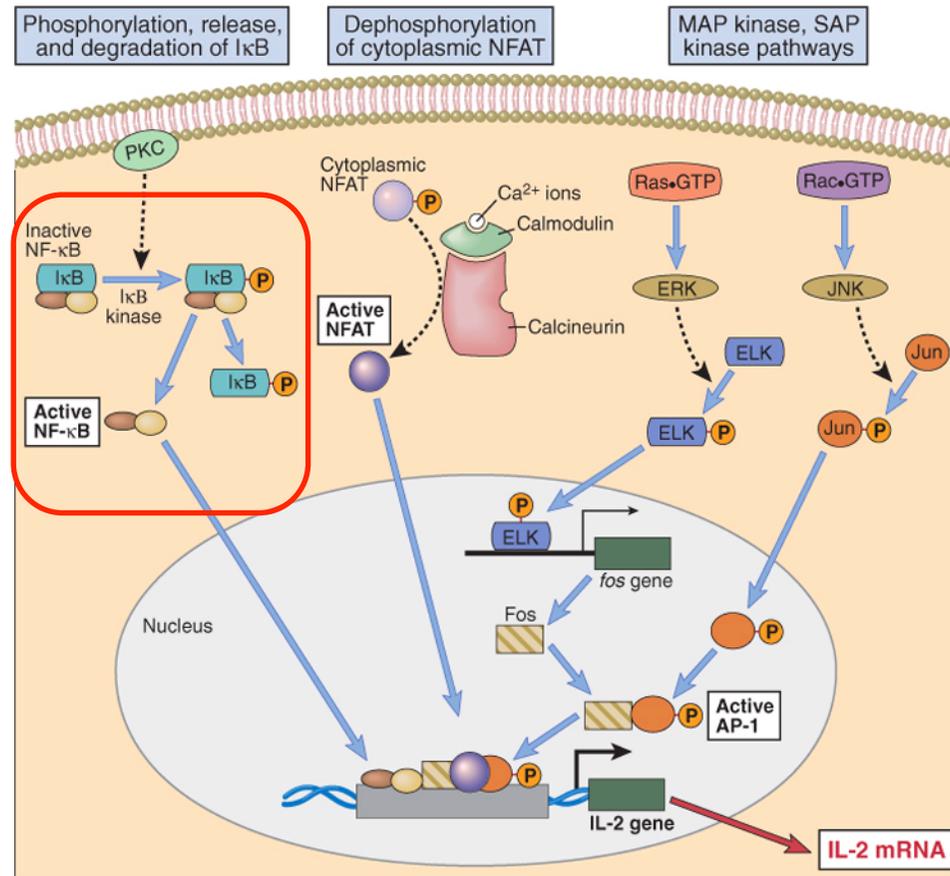


Blocco dell'espansione clonale cellule T



Meccanismo d'azione della rapamicina

➤ Inibizione della chinasi **mTOR**



La rapamicina lega una immunofilina della famiglia FKBP



Il complesso formato lega la chinasi mTOR



Viene bloccato il segnale della chinasi AKT attivata dal TCR e CD28



Il fattore trascrizionale NF-kB resta inattivo



Blocco del ciclo cellulare e apoptosi delle cellule T

