

Tolleranza ed autoimmunità. Aspetti biologici.

Sergio Romagnani

Direttore Sezione di Medicina Interna, Immunoallergologia e Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze

1. Introduzione

Con il termine di tolleranza immunologica si intende la perdita della capacità del sistema immunitario a rispondere ad un determinato antigene, indotta da un precedente incontro con lo stesso antigene. Gli antigeni capaci di indurre uno stato di tolleranza sono chiamati antigenitollerogenici o tollerogeni, per distinguerli da quelli capaci di generare una risposta immune (immunogeni). Uno dei principali aspetti della tolleranza immunologica è quella che si verifica normalmente nei confronti degli antigeni autologhi ("self"), designata tolleranza al "self". Quando il sistema immunitario di un organismo reagisce nei confronti di antigeni autologhi, può verificarsi un danno tissutale, riconosciuto fin dall'inizio del secolo, per il quale fu coniato il termine decisamente suggestivo di *horror autoxicus*, successivamente modificato in quello ancora attualmente in uso di autoimmunità. Circa cinquanta anni dopo, con la formulazione dell'ipotesi della selezione clonale, al fine di spiegare il meccanismo attraverso il quale l'organismo è generalmente in grado di evitare l'evenienza di reazioni autoimmuni, venne suggerita la possibilità che i cloni linfocitari reattivi nei confronti degli autoantigeni venissero eliminati (delezione) durante il processo di sviluppo del sistema immunitario. Questa ipotesi appare ancora sostanzialmente corretta, anche se gli studi degli ultimi anni hanno permesso di modificarla e di ampliarla notevolmente.

In questa trattazione saranno sommariamente descritti i meccanismi che sono attualmente considerati responsabili del processo di tolleranza immunologica, nonché le principali modalità attraverso le quali l'assenza o la perdita della tolleranza immunologica nei confronti degli autoantigeni può provocare una risposta immunitaria nei confronti del "self" e quindi la possibile insorgenza di una malattia autoimmune.

2. Modalità di sviluppo della tolleranza immunologica

Quando i linfociti incontrano l'antigene specifico si possono verificare tre condizioni: (1) il linfocita viene attivato e ciò determina la risposta immune specifica; (2) il linfocita viene inattivato od eliminato e ciò determina la tolleranza nei confronti di quell'antigene; (3) l'antigene non induce alcuna risposta, né di tipo positivo, né di tipo negativo (ignoranza). Esistono due principali modalità di induzione della tolleranza immunologica, la tolleranza centrale e la tolleranza periferica.

2.1 Tolleranza centrale

La tolleranza centrale si verifica quando i linfociti incontrano il rispettivo antigene durante il loro processo maturativo a livello degli organi linfatici centrali (midollo osseo per i linfociti B, timo per i linfociti T). In tal caso, essi non vengono attivati, ma divengono tolleranti nei confronti di quell'antigene. In genere, gli antigeni esistenti ad alte concentrazioni a livello degli organi linfatici primari sono gli autoantigeni, in quanto gli antigeni provenienti dall'ambiente esterno vengono generalmente catturati dalle cellule dell'immunità naturale e trasportati verso gli organi linfatici secondari (milza, linfonodi, tessuti linfoidei delle mucose). I linfociti immaturi, dotati di recettori ad alta affinità nei confronti degli autoantigeni incontrati a livello degli organi linfatici primari durante il loro sviluppo, vengono eliminati.

Questo processo di delezione consente di eliminare la grande maggioranza dei cloni linfocitari reattivi nei confronti degli autoantigeni ubiquitari. Dal momento che l'incontro tra un linfocita immaturo con il rispettivo antigene risulta nella sua delezione o comunque in un suo arresto funzionale, mentre l'incontro tra un linfocita maturo e l'antigene dà luogo ad attivazione, proliferazione e differenziazione funzionale, è verosimile che il riconoscimento dell'antigene determini segnali funzionali diversi nel linfocita immaturo rispetto a quello maturo. Tali differenze rimangono tuttavia ancora sconosciute, anche se è molto probabile che esse siano riferibili, almeno in parte, all'assenza o alla presenza di segnali co-stimolatori forniti ai linfociti maturi a livello degli organi linfatici secondari dalle cellule dell'immunità naturale.

2.1.1 Tolleranza centrale verso i linfociti B

La tolleranza centrale nei confronti dei linfociti B autoreattivi avviene nel midollo osseo e si verifica attraverso una delezione dei linfociti B immaturi dotati di recettori ad elevata affinità per autoantigeni presenti nel microambiente midollare. Questo processo si verifica più frequentemente con antigeni multivalenti, quali le molecole di superficie o le molecole polimeriche come il DNA a doppia elica, che interreagiscono con più recettori immunoglobulinici sulla stessa cellula B, determinando un segnale molto potente. Il principale meccanismo di eliminazione dei linfociti B immaturi autoreattivi è la morte apoptotica. In taluni casi, tuttavia, i linfociti B immaturi dopo il loro incontro con l'autoantigene, anziché essere deleti, rispondono riattivando i loro geni RAG-1 e RAG-2 ed esprimendo una nuova catena leggera immunoglobulinica e di conseguenza una nuova specificità antigenica. Questo processo è stato definito revisione recettoriale ("receptor editing").

2.1.2 Tolleranza centrale verso i linfociti T (selezione negativa)

La tolleranza centrale nei confronti dei linfociti T autoreattivi si verifica nel timo ed è classicamente conosciuta con il termine di selezione negativa. La selezione negativa è determinata principalmente dalla concentrazione dell'autoantigene a livello timico e dal grado di affinità per tale antigene del recettore linfocitario T (T cell receptor - TCR). I peptidi autoantigenici sono presentati in associazione con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità ("Major Histocompatibility Complex" - MHC-) ed i linfociti T immaturi doppio-positivi (CD4+CD8+) con TCR ad elevata affinità per il complesso peptide-MHC vanno incontro ad un processo di morte programmata o apoptotica, designata delezione clonale. Tale processo interessa sia le cellule T ristrette per MHC di classe I o di classe II e quindi risulta in uno stato di tolleranza sia dei linfociti CD4+ che CD8+. Come conseguenza, tra i linfociti T CD4+ o CD8+ maturi che

lasciano il timo non vi sono più cellule capaci di riconoscere gli autoantigeni presenti a livello timico. I meccanismi molecolari e la stessa sede timica dove ha luogo la selezione negativa sono ancora oggetto di studi e di controversie. Negli ultimi anni tuttavia sta emergendo con vigore l'ipotesi che la selezione negativa si verifichi a livello delle aree midollari del timo e che in essa giochino un ruolo prevalente le cellule epiteliali della midollare. Tra le molecole coinvolte nel processo apoptotico non sembrano svolgere un ruolo di primo piano il Fas ed il suo ligando (Fas-L), che sono invece importanti nei processi apoptotici della tolleranza periferica (vedi sotto). Nella selezione negativa timica sembra invece giocare un ruolo il CD30, un'altra molecola della famiglia dei recettori del TNF. Infatti, i topi deficienti in CD30 mostrano un'alterazione della selezione negativa; inoltre i timociti di topi transgenici per CD30 vanno incontro ad apoptosi in seguito a "cross-linking" del CD30 ed il fenomeno viene esaltato dal "cross-linking" del loro TCR. Noi stessi abbiamo dimostrato la presenza costitutiva del CD30 in una piccola famiglia di timociti midollari umani, nonché una espressione particolarmente intensa del ligando del CD30 (CD30L) sia nelle cellule epiteliali della midollare, sia nello strato esterno dei corpuscoli di Hassal. In questo processo giocano anche un ruolo fondamentale chemochine prodotte dalle cellule dendritiche, dai macrofagi e soprattutto dalle cellule epiteliali timiche, quali SDF-1, IP-10, MDC, TARC, ELC e TECK. Tali chemochine probabilmente attraggono i diversi tipi di timociti a secondo della fase del loro processo maturativo, favorendone la progressione dalle aree più esterne della corticale fino alla midollare ed infine ai vasi che immettono i timociti maturi sfuggiti ai processi selettivi nel torrente circolatorio. Ad esempio, abbiamo recentemente dimostrato che MDC é prodotto in grandi quantità dalle cellule epiteliali della midollare attrae verso quest'ultima i linfociti corticali dotati del recettore chemochinico CCR4, che hanno subito la selezione positiva, ma non ancora quella negativa. Per contro, ELC, prodotto dalle cellule epiteliali prevalentemente disposte in sede perivasale, sembra coinvolto nella attrazione dei timociti sfuggiti alla selezione negativa ed ormai maturi, i quali esprimono il recettore chemochinico CCR7, al fine di favorire la loro immissione nel torrente circolatorio.

2.2. Tolleranza periferica

La tolleranza periferica é più importante di quella centrale per mantenere la tolleranza confronti di quegli autoantigeni che non sono rappresentati a livello timico o midollare, ma sono invece espressi nei tessuti periferici. Esistono infatti numerosi cloni di linfociti maturi i quali sfuggono al processo di selezione negativa per mancanza di contatto con gli autoantigeni e che sono quindi potenzialmente autoreattivi. Ciò nonostante, quando questi cloni incontrano il rispettivo autoantigene a livello periferico la loro risposta é impedita o fortemente regolata, suggerendo in tal modo l'esistenza di meccanismi che consentono il mantenimento della tolleranza al "self" anche nei confronti degli autoantigeni presenti solo in periferia. La tolleranza periferica nei confronti dei linfociti B si verifica essenzialmente quando i linfociti B maturi incontrano l'autoantigene specifico nei tessuti periferici in assenza del linfocita T "helper" specifico. In tale condizione ambientale, i linfociti B autoreattivi divengono funzionalmente incapaci di rispondere all'antigene, oppure sono addirittura esclusi dai follicoli linfatici. Il meccanismo di esclusione follicolare può essere rappresentato dalla perdita dei recettori

per le chemochine, che normalmente attraggono i linfociti B maturi all'interno dei follicoli. A differenza della tolleranza periferica nei confronti dei linfociti B, la tolleranza periferica nei confronti dei linfociti T autoreattivi può verificarsi attraverso tre meccanismi principali. Tali meccanismi sono: l'anergia, la delezione, la soppressione.

2.2.1. Anergia clonale

L'anergia clonale si verifica quando il linfocita T maturo incontra il peptide specifico nella nicchia del complesso MHC di una cellula presentante ("antigen-presenting cell" - APC), la quale sia priva delle molecole co-stimolatorie, in particolare di B7-1 e B7-2. È infatti accertato che l'attivazione linfocitaria avviene solamente in seguito ad un doppio segnale, rappresentato dall'interazione tra recettore linfocitario e antigene (primo segnale) e dalla interazione della molecola CD28 con le molecole co-stimolatorie B7 (secondo segnale). Il ricevimento del primo segnale, ma non del secondo, determina nel linfocita uno stato di non responsività funzionale, anziché uno stato di attivazione. Un'altra possibilità è che il linfocita T utilizzi nell'interazione con le molecole co-stimolatorie dell'APC una molecola inibitoria (CTLA-4), come dimostrato dall'osservazione che i topi deficienti di questo gene sviluppano un'attivazione linfocitaria incontrollata ed una forma di autoimmunità sistemica.

Questi rilievi suggeriscono l'importanza della natura delle APC nel determinismo dello sviluppo della tolleranza e, per converso, dell'autoimmunità. Infatti le APC che risiedono negli organi linfoidi periferici e nei tessuti non linfoidi sono in fase di riposo e non esprimono molecole co-stimolatorie, per cui la presentazione dell'antigene da parte di tali cellule può provocare l'anergia clonale del linfocita T. Tuttavia, non è noto quali autoantigeni siano in grado di indurre anergia nei linfociti T, né quale sia il destino delle cellule T anergiche. Anche i meccanismi biochimici che sottintendono lo sviluppo dell'anergia sono poco conosciuti.

Un altro meccanismo di anergia è rappresentato dall'incontro del linfocita T maturo con una APC dotata di molecole co-stimolatorie, ma che presenta un peptide con residui aminoacidici alterati nella zona di contatto con il TCR. Questi antigeni mutati sono chiamati antagonisti peptidici ed appartengono alla categoria dei ligandi peptidici alterati. In questa evenienza la cellula T riceve un secondo segnale normale, ma il primo segnale è anormale. Anche i meccanismi biochimici coinvolti in questa forma di anergia sono poco noti e non è ancora chiaro se essa si verifichi nell'organismo in condizioni fisiologiche, cioè a prescindere da manipolazioni sperimentali.

2.2.2 Delezione clonale

La delezione clonale dei linfociti T maturi si verifica in genere in seguito alla persistente stimolazione da parte dell'antigene, che risulta in un processo noto come morte cellulare indotta dall'attivazione ("activation-induced cell death" - AICD-). La AICD è una forma di apoptosi indotta da segnali che originano da recettori "di morte" presenti sulla membrana, il più importante dei quali è Fas. Il ligando del Fas (FasL), interagendo con Fas, attiva nella cellula una serie di cistino-proteasi intracellulari, chiamate caspasi, che determinano la morte apoptotica della cellula. Le cellule in apoptosi vengono rapidamente rimosse dai fagociti e quindi non inducono fenomeni infiammatori. L'effetto finale è una delezione dei linfociti T specifici per l'antigene che ha provocato la loro stimolazione ripetuta. La AICD mediata dalla interazione Fas/FasL è infatti potenziata dalla presenza di elevate concentrazioni di IL-2, il principale fattore

di crescita dei linfociti T. A conferma di quanto sopra, va rilevato che sia i topi deficienti in Fas o con mutazioni a livello di Fas-L, sia quelli deficienti in IL-2, sviluppano spontaneamente malattie autoimmuni. È verosimile dunque che la tolleranza immunologica basata sulla AICD si espliciti prevalentemente nei confronti di autoantigeni periferici che, a causa della loro abbondanza, attivano frequentemente i linfociti T.

2.2.3 Soppressione da linfociti T

Alcune risposte immunitarie verso autoantigeni sono inibite da linfociti che producono citochine capaci di bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettori. Questi linfociti inibitori sono anche chiamati linfociti T soppressori. Mentre originariamente si era ritenuto che tali linfociti appartenessero ad una popolazione cellulare distinta sia dai linfociti T "helper", sia dai linfociti T citotossici, l'orientamento attuale è che tale funzione possa essere svolta da popolazioni linfocitarie diverse, anziché da un'unica popolazione specializzata. Le citochine soppressive più importanti sono il TGF- β , che inibisce sia la proliferazione dei linfociti T che dei linfociti B, la IL-10 che inibisce l'attivazione dei macrofagi, la IL-4 che antagonizza l'azione dell'IFN- γ . La IL-4 e la IL-10 sono prodotte principalmente dai linfociti Th2; i linfociti T che oltre alla IL-4 e alla IL-10 producono anche TGF- β sono stati designati Th3. La conversione di una risposta linfocitaria T associata con un determinato "set" di citochine, per esempio di tipo Th1, ad un tipo di risposta caratterizzato dalla produzione di citochine diverse, quali quelle Th2 o Th3, è stata denominata deviazione immune.

2.3 Ignoranza clonale

L'ignoranza clonale rappresenta una terza modalità di mantenimento della tolleranza basata sulla incapacità di linfociti autoreattivi di rispondere ad autoantigeni, senza andare incontro a morte apoptotica e senza divenire anergici. Questa modalità si estrinseca di solito nei confronti degli autoantigeni presenti in siti anatomici inaccessibili (occhio, sistema nervoso centrale), ma può verificarsi anche nei confronti di autoantigeni apparentemente accessibili ai linfociti. Il motivo per cui alcuni linfociti T maturi incontrando l'antigene specifico diventano anergici, mentre altri linfociti T tendono semplicemente ad ignorarlo, è tuttora sconosciuto. Una possibile spiegazione è che gli antigeni presenti ad alta concentrazione inducano anergia clonale, mentre quelli presenti a concentrazioni molto ridotte in assenza del secondo segnale vengano ignorati.

3. Meccanismi di autoimmunizzazione

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, appare chiaro che sia la deficienza che l'alterazione dei meccanismi normalmente responsabili del mantenimento della tolleranza possono determinare una risposta del sistema immunitario nei confronti del "self" e quindi provocare l'insorgenza di fenomeni di autoimmunizzazione. Tale potenzialità esiste in tutti gli individui in quanto i linfociti di tutti gli individui esprimono recettori specifici per autoantigeni ed in quanto molti autoantigeni sono facilmente accessibili alle cellule del sistema immunitario. Poiché i meccanismi

fondamentali per lo sviluppo e il mantenimento della tolleranza al "self" sono rappresentati dalla eliminazione dei linfociti immaturi che incontrano gli autoantigeni durante il loro processo di sviluppo (selezione negativa) e dalla delezione o inattivazione funzionale dei linfociti maturi che incontrano autoantigeni nel corso della vita, la perdita della tolleranza nei confronti degli autoantigeni può essere la conseguenza sia di una selezione anomala dei linfociti autoreattivi, cioè di un difetto della tolleranza centrale, sia di alterazioni della presentazione degli autoantigeni alle cellule del sistema immunitario, cioè di un'anomalia della tolleranza periferica.

L'autoimmunità può ovviamente risultare da anomalie dei linfociti B, dei linfociti T o di entrambe le popolazioni linfocitarie. Tuttavia, le anomalie dei linfociti T sono certamente più importanti in quanto i linfociti T non solamente rappresentano le cellule centrali di tutte le risposte immuni nei confronti degli antigeni proteici, sia con riferimento alle reazioni cellulo-mediate che alla produzione di autoanticorpi, ma soprattutto perché molte malattie autoimmuni sono legate geneticamente a MHC, la cui principale funzione è quella di presentare i peptidi ai linfociti T.

3.1 Deficit dei meccanismi di tolleranza centrale

Potenzialmente un difetto nei meccanismi di tolleranza centrale rappresenta un modello ideale per spiegare la persistenza di cloni T autoreattivi e quindi l'insorgenza di un processo di autoimmunizzazione. Non esistono tuttavia prove formali sull'importanza di un tale deficit, in quanto è possibile che i meccanismi responsabili della tolleranza periferica sono in ogni caso sufficienti ad evitare la responsività del sistema immunitario nei confronti degli autoantigeni.

3.2 Deficit dei meccanismi di tolleranza periferica

Esistono numerosi dati sperimentali che suffragano il possibile ruolo di difetti dei meccanismi di tolleranza periferica nello sviluppo delle malattie autoimmuni.

3.2.1 Espressione aberrante di molecole co-stimolatorie

La rottura della tolleranza periferica può avvenire a causa di processi infiammatori capaci di attivare le APC in fase di riposo presenti a livello tissutale inducendo su tali cellule l'espressione aberrante delle molecole co-stimolatorie necessarie alla presentazione di autoantigeni. Sia sufficiente ricordare al riguardo la possibilità di indurre una encefalomyelite autoimmune ed una tiroidite autoimmune negli animali da esperimento mediante somministrazione di autoantigeni organo-specifici in associazione con adiuvante completo di Freund, oppure provocare la comparsa del diabete mellito di tipo I mediante la contemporanea espressione transgenica sulle cellule beta delle isole pancreatiche di un antigene virale e della molecola co-stimolatoria B7-1.

3.2.2 Difetto di molecole inibitorie dei processi di co-stimolazione

Una seconda possibilità di rottura della tolleranza periferica può essere legata al verificarsi di un difetto di espressione o di funzione delle molecole normalmente devolute alla inattivazione dei processi di co-stimolazione. Abbiamo già ricordato come topi resi deficienti del gene CTLA-4 vadano incontro ad una forte attivazione dei linfociti T e ad una forma fatale di autoimmunità.

3.2.3 Mutazioni interferenti con l'apoptosi dei linfociti T maturi

La perdita della tolleranza periferica e quindi il manifestarsi di una patologia autoimmune può essere la conseguenza di mutazioni che interferiscono con la morte apoptotica dei linfociti maturi. Topi geneticamente deficienti in Fas (lpr/lpr) o in FasL (gld/gld) vanno incontro ad una malattia autoimmune sistemica spontanea e di recente sono stati descritti alcuni casi di bambini affetti da una forma fenotipicamente simile di malattia nei quali era riscontrabile una mutazione a livello di fas o di geni coinvolti nel modello di apoptosi Fas-mediata.

3.2.4 Difetto della soppressione mediata dai linfociti T

L'autoimmunità può insorgere infine a causa di un difetto nei meccanismi di soppressione mediata dai linfociti T, in particolare di quelli capaci di produrre citochine regolatorie. Tale evenienza è suffragata dagli esperimenti che hanno dimostrato la possibilità di prevenire mediante trasferimento contemporaneo di linfociti T attivati, un'autoimmunità sistemica indotta dal trasferimento di linfociti T "naive".

4. Considerazioni conclusive

Da quanto sopra esposto, appare chiaro che l'autoimmunità rappresenta una evenienza fondamentale legata ad anomalie dei processi fisiologici di induzione e di mantenimento della tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti del "self". Tali processi sono molteplici e possono essere alterati sia a causa di anomalie genetiche, sia soprattutto in seguito ad eventi che si verificano nel corso della vita in seguito al complesso gioco di interazioni tra sistema immunitario ed i numerosi agenti biologici che continuamente tale sistema è chiamato a controbattere ed a neutralizzare al fine di salvaguardare l'omeostasi dell'organismo. Un tale concetto è peraltro anche suffragato dall'osservazione che i geni più frequentemente associati con le malattie autoimmuni sono i geni del MHC ed in particolare quelli di classe II, cioè gli stessi geni coinvolti nella presentazione degli antigeni ai linfociti. È pertanto altamente verosimile che risposte del sistema immunitario verso agenti infettivi di vario tipo possano determinare la rottura della tolleranza immunologica verso gli autoantigeni e quindi dare inizio al processo di autoimmunizzazione, nonostante che non sia possibile mettere in evidenza la presenza di microrganismi non solamente a livello delle sedi di lesione, ma neppure negli individui nei quali la malattia autoimmune si sviluppa. Tuttavia le infezioni possono scatenare il processo di autoimmunizzazione sia attivando nelle aree infiammatorie l'espressione delle molecole co-stimolatorie nelle APC tessutali altrimenti in fase di riposo, sia favorendo la trasformazione di autoantigeni in neoantigeni parzialmente "cross"-reattivi, sia provocando la liberazione di autoantigeni normalmente "sequestrati" ed inaccessibili per il sistema immunitario. Quest'ultimo processo può anche verificarsi talora in seguito a danneggiamenti tessutali conseguenti a traumi, come avviene ad esempio nella uveite post-traumatica e nell'orchite secondaria a vasectomia. Infine, alcuni agenti infettivi possono condividere antigeni "cross"-reattivi con autoantigeni, tali cioè da indurre una risposta immune che interessa anche il "self" ("molecular mimicry"). L'esempio più classico di quest'ultima possibilità è rappresentato dalla febbre reumatica, che si sviluppa dopo una infezione streptococcica

ed é causata dalla produzione di anticorpi anti-streptococcici i quali, "cross"-reagendo con proteine miocardiche, possono determinare un processo miocarditico. In conclusione, l' autoimmunità appare tuttora come uno degli enigmi clinici e scientifici di maggiore interesse. Tuttavia l'applicazione delle nuove biotecnologie e il grande progresso delle conoscenze sui meccanismi responsabili della tolleranza immunologica fa sperare che presto anche in questo settore della biomedicina sarà possibile raggiungere ulteriori certezze e ciò renderà certamente meno empirico anche l'approccio del clinico nella terapia delle malattie autoimmuni.