

# APPUNTI DI IMMUNOLOGIA

## Una breve viaggio fra storia, teorie ed evidenze scientifiche

### II sezione

a cura di A. Martella

## CAPITOLO I

### La figura dell'Immunologo teorico

Fra i tanti ricercatori che hanno abbracciato le teorie della selezione clonale e del network immunitario, autore principale N. K. Jerne, spicca Geoffrey W. Hoffmann, autore a sua volta della *teoria della rete simmetrica*.

Geoffrey W. Hoffmann aveva già lavorato in biologia teoretica sul paradosso di Leslie Orgel nella teoria sull'origine della vita ([Leslie Orgel's paradox](#)).

Successivamente Hoffmann entra a far parte dell'Istituto di immunologia di Basilea, in cui conosce Niels Jerne.

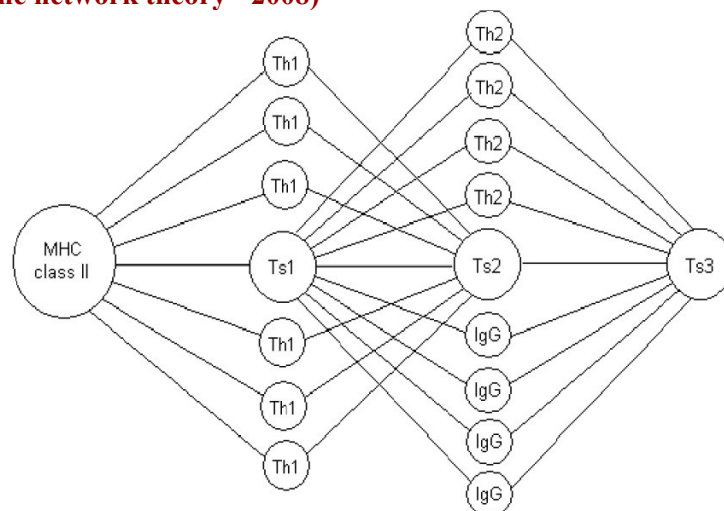
Lo studio delle teorie di Jerne diviene, e rimane, il principale obiettivo delle sue ricerche.

Infatti, a Basilea sviluppa la teoria della rete immunitaria simmetrica basata sulle ipotesi di Jerne. Questa teoria coinvolge simmetriche interazioni stimolatorie, inibitorie e di citolisi, elaborando un quadro che permette di comprendere, con un piccolo numero di postulati, un numero di fenomeni immunologici non facilmente spiegabili altrimenti.

Con molta approssimazione possiamo dire che il network simmetrico idiotipico consiste in una serie di cellule e molecole che vengono attivate in seguito ad una perturbazione dell'equilibrio.

Esempio di modello di rete idiotipico di regolazione del sistema immunitario che include il sistema di istocompatibilità MHC classe II, cellule T helper di 2 tipi, Th1 e Th2, cellule T soppressorie di 3 tipi, Ts1, Ts2 e Ts3 e anticorpi IgG sierici.

(Da Hoffmann - **Immune network theory - 2008**)



La teoria della rete immunitaria simmetrica offre un modello di patogenesi dell'HIV basato su una reazione autoimmune antilinfociti T scatenata dal virus HIV. Questo rende estremamente difficile la preparazione di un vaccino, alla cui ricerca di base Hoffmann si dedica con il suo laboratorio presso la University of British Columbia.

Hoffmann, fra l'altro, ha contribuito allo studio delle analogie tra il sistema immunitario e il sistema

nervoso.

Chi è interessato, può scaricare la **teoria della rete simmetrica** di Hofmann dal web, da un suo testo liberamente fruibile "Immune Network Theory" di Geoffrey W. Hoffmann - The University of British Columbia, 2008.

Nel nostro caso, lo scopo è delineare la figura, le intenzioni e i procedimenti di un immunologo teorico e tutto questo è ben delineato nel I capitolo del suo libro che vi offriamo qui di seguito.

## **Immune Network Theory**

### Prefazione del libro

*La teoria della rete immunitaria (Immune network theory) è stata sviluppata dagli anni '70 ed è stata ampiamente pubblicata su riviste e capitoli di libri, compresi gli atti di conferenze. Questa monografia presenta ed estende lo scopo di una versione della teoria della rete immunitaria chiamata teoria della rete simmetrica (symmetrical network theory).*

*Il tema della regolazione del sistema immunitario è enorme e la selezione dei fatti forniti dai libri di testo convenzionali non è orientata alla comprensione del sistema immunitario in termini di network.*

*In un tipico manuale di immunologia l' "idea network" è appena accennata, e la maggior parte dei laureati non sono a conoscenza della vasta letteratura sperimentale e teorica che esiste sul Network.*

### **Immunologia: molta sperimentazione, poca teoria**

Non credo in alcun esperimento,  
fino a quando non sarà confermato dalla teoria  
-Arthur Eddington

### **Ipotesi, modelli e teorie**

Il sistema immunitario è un obiettivo fondamentale della ricerca medica. Questo libro parla di una teoria per capire come il sistema immunitario si regola da solo.

Cos'è una teoria? Una teoria può essere definita come un insieme di ipotesi ed un modello in cui si incastrano le evidenze scientifiche. Un'ipotesi o postulato scientifico è un'idea su come funziona qualcosa. Un modello è un insieme di ipotesi, che può aiutarci a capire come funziona un sistema. Una teoria è un modello ben sviluppato.

### **L'ipotesi del network immunitario**

Nei primi anni '70 un eminente immunologo danese che lavorava in Svizzera innescò una rivoluzione nella nostra comprensione del sistema immunitario. Niels Jerne ha proposto che le cellule e le molecole del sistema immunitario non solo riconoscono le sostanze estranee, ma si riconoscono, rispondono e sono regolate l'una dall'altra in una specie di equilibrio dinamico.

Ne consegue che dovremmo considerare il sistema immunitario come una rete di cellule e anticorpi interagenti [N. K. Jerne (1974) [Towards a Network Theory of the Immune System, Ann.Immunol. \(Inst. Pasteur\), 125C, 373-389](#)]. Questa prospettiva è conosciuta come la teoria della rete idiotipica, o più semplicemente la teoria del Network immunitario. L'idea è che le cellule del sistema immunitario siano funzionalmente connesse tramite componenti variabili caratterizzate da enorme diversità (regioni V), e ogni cellula è collegata a un piccolo sottogruppo di altre cellule tramite interazioni tra regioni V.

Le proprietà importanti di questo sistema, inclusa la memoria, sono quindi proprietà dell'intera rete di cellule nel suo complesso, piuttosto che di cellule considerate isolatamente. Questo era un paradigma rivoluzionario per l'immunologia e da allora sono stati fatti molti progressi verso la comprensione del sistema immunitario.

## **L'ipotesi diventa una teoria**

La formulazione di un insieme di postulati espliciti e consistenti, lo sviluppo di modelli matematici basati su tali postulati e la raccolta di prove sperimentali a sostegno dei postulati hanno nel frattempo trasformato l'ipotesi del network immunitario in una teoria.

La teoria della rete immunitaria è centrale per l'immunologia così come la teoria della selezione clonale, di cui la "rete" ne è stata la logica conseguenza. Possiamo aspettarci che la teoria della rete sarà importante per sviluppare una migliore comprensione anche di malattie autoimmuni, di allergie e forse anche del cancro.

Nei corsi universitari sull'immunologia cellulare, l'idea di rete non è trattata in modo approfondito e il fatto che la regolazione specifica del sistema immunitario sia più facilmente comprensibile in termini di meccanismi di rete non è molto apprezzato.

Manca una presentazione pedagogica sulla teoria del network immunitario, e questo libro è un tentativo di offrirla agli studenti.

## **Lo strumento dei modelli matematici**

I libri di testo per le scienze della vita non contengono tradizionalmente molta matematica, e molti ricercatori devono ancora ammettere che la matematica ha un ruolo importante in biologia.

La rilevanza della matematica in immunologia è evidente quando bisogna sviluppare specifici modelli di rete immunitaria.

Questo libro ha lo scopo di rendere le idee sul network immunitario ampiamente accessibili. È scritto per medici, biologi, fisici e lettori di riviste scientifiche popolari. Anche se contiene alcune formule e regole matematiche, le idee principali sono presentate in modo che possano essere comprensibili e apprezzabili anche da chi non è interessato alle formulazioni matematiche.

Proprio come un ricercatore teorico può apprendere i principi e i risultati degli esperimenti di immunologia senza avere le conoscenze e le capacità di un immunologo sperimentale, i ricercatori sperimentali possono apprendere i principi e i risultati di esperimenti computazionali senza avere le conoscenze e le capacità di un teorico.

Le scienze matematiche sono uno strumento per dare una struttura scientifica alle dinamiche di un sistema e aggiungono rigore allo sviluppo delle idee.

Il principale sistema utilizzato è il calcolo, in particolare le equazioni differenziali ordinarie non lineari accoppiate.

Comunque il lettore sarà in grado di comprendere i diagrammi matematici senza necessariamente entrare nei dettagli della matematica

Abbiamo imparato molto sulla regolazione della rete immunitaria, ma c'è ancora molta strada da fare.

Constateremo in futuro un bisogno crescente per gli immunologi di investire in ricerca tramite lo strumento investigativo della modellazione matematica. Il numero di immunologi formati anche nelle scienze fisiche e matematiche è esiguo. Essi avranno una parte importante da giocare nella esauriente delucidazione dei meccanismi di regolazione immunitaria.

Un modello è un insieme di postulati di un sistema. La costruzione di un modello nella biologia teorica può iniziare da una concezione ampia, relativamente indifferenziata, che diventa sempre più definita gradualmente man mano che se ne stabilisce la struttura con strumenti matematici.

Definizione: *un modello matematico è una formulazione matematica di un insieme di postulati.*

I modelli matematici sono potenti strumenti per analizzare le risultanze di un determinato insieme di postulati.

L'insieme di postulati espliciti di un sistema deve essere tradotto in forma di equazioni.

Il modello matematico riflette in genere sia le complessità non lineari (2) sia le semplificazioni, ambedue inerenti ai postulati. Possiamo quindi studiare il comportamento del modello matematico e osservare se ha proprietà simili al sistema biologico di interesse.

(2) - I modelli lineari sono modelli in cui le variabili e/o le loro cinetiche di cambiamento sono in rapporto lineare con le altre variabili, ad esempio

$$dx/dt = \text{frequenza della variazione di } x = ax + by$$

$$dy/dt = \text{frequenza della variazione di } y = cx + dy$$

è una coppia di equazioni differenziali che descrive la frequenza della variazione in  $x$  e  $y$  come funzioni lineari di  $x$  e  $y$ . I sistemi lineari sono prontamente risolti e rappresentano un comportamento più semplice rispetto ai sistemi non lineari, che contengono termini come  $x^2$  e  $xy^2$ . I modelli dei sistemi biologici di nostro interesse, incluso il sistema immunitario, sono in genere sistemi non lineari.

Possiamo verificare se le semplificazioni comportano la perdita delle proprietà che stiamo osservando. D'altra parte, la non-linearità di un modello da spesso origine a comportamenti inattesi e imprevedibili.

Se il modello non ha le proprietà attese (osservate sperimentalmente), sappiamo che ci deve essere qualcosa di sbagliato nell'insieme di postulati che abbiamo elaborato, e occorre ricorrere a un diverso, a volte più complesso, insieme di postulati.

In questo modo i modelli matematici sono filtri efficaci per la corretta formulazione delle idee. Proprio come gli esperimenti, possono essere usati per determinare quali concetti (o combinazioni di concetti) potrebbero essere corretti e quali sono sicuramente sbagliati.

### **L'immunologia sperimentale costituisce il punto di partenza**

Lavorare sulla **teoria della rete immunitaria** richiede l'apprendimento della lingua dell'immunologia cellulare sperimentale.

Questo libro include un'introduzione a tale linguaggio. Il trattamento delle basi sperimentali dell'immunologia di rete è comunque ridotta al minimo essenziale.

Alcune osservazioni sperimentali importanti per scegliere tra modelli alternativi saranno presentate in dettaglio, mentre molti sistemi sperimentali (che hanno a che fare con l'immunologia di rete ma non direttamente con la teoria della rete immunitaria come qui rappresentata) non sono inclusi.

Questo procedimento è destinato ad essere percepito come un'esposizione autonoma di fatti sperimentali con una teoria che li lega insieme.

Pertanto, c'è chi vorrà integrare con un manuale di immunologia convenzionale, ad esempio "**Introduzione all'immunologia**" di John W. Kimball (Macmillan), insieme alla lettura di alcuni testi della letteratura originale.

Un problema per l'immunologo teorico del network immunitario è la pleora di esperimenti pubblicati. Circa 8000 articoli sono pubblicati ogni anno in riviste di immunologia.

Quali di questi sono più rilevanti e quali sono di secondaria importanza?

A quali risultati sperimentali è stata data la giusta interpretazione?

La maggior parte degli studi sperimentali fondamentali per l'immunologia di rete hanno più di due decenni. In questo campo, ricerca "più vecchia" non significa necessariamente "inferiore".

Gli esperimenti sono più o meno importanti nel contesto di teorie specifiche e a loro volta le teorie sono più o meno importanti nel contesto di esperimenti specifici.

Questa reciproca interdipendenza di esperimenti e teorie potrebbe essere interrotta in qualche modo, e per questo abbiamo bisogno di criteri scientifici per la valutazione delle teorie.

Troveremo che molti vecchi esperimenti sulla regolazione del sistema immunitario sono semplici e importanti nel contesto della teoria della rete immunitaria.

### **Valutazione di teorie in competizione**

Quello che segue è un insieme di caratteristiche scientificamente essenziali che una teoria sui meccanismi di regolazione del sistema immunitario dovrebbe avere per essere accettabile. Questo insieme fornisce una base per confrontare le teorie proposte, da un punto di vista sistematico e obiettivo.

#### a) Semplicità

Più semplice è, migliore è una teoria. Questo criterio fu enunciato nel quattordicesimo secolo dal teologo e filosofo William di Ockham. La sua formulazione era "la pluralità non dovrebbe essere assunta se non necessaria", che è conosciuta come "il rasoio di Ockham".

"Pluralità" è nel nostro caso sinonimo di "complessità".

Il rasoio di Ockham è in effetti un sistema preciso e sensibile che spesso separa una buona teoria da teorie meno credibili. Può sembrare che quanto più una teoria sia complessa (cioè più ricca di postulati), tanto più saremo in grado di spiegare la fenomenologia, e quindi potremmo essere in grado di fare previsioni più verificabili.

Tuttavia, una teoria con molti postulati è frutto di una minore elaborazione ed è improbabile che sia inattaccabile o insostituibile. Se per ogni fenomeno da spiegare, costruiamo un postulato, finiremo per avere una teoria con un pesante eccesso di postulati. Come nel caso del mistero di un omicidio, un dato insieme di fatti può essere spiegato da teorie complesse, ma in genere una unica teoria semplice può spiegare in modo sintetico, elegante ed inoppugnabile lo stesso insieme di fatti.

Rispetto ad una teoria semplice, la teoria complessa finisce per apparire inverosimile.

È più convincente avere un unico postulato che permette la comprensione di molteplici aspetti di un caso o di un esperimento, perché in generale questa situazione è più rispondente alla realtà naturale.

Infine gli errori di una teoria semplice sono più facilmente identificabili e confutabili, dal momento che ci sono meno parametri che intervengono per spiegare i risultati sperimentali.

In genere una teoria semplice ha anche un potere predittivo maggiore rispetto a una teoria complessa, anche perché ci sono meno parametri da tenere sotto controllo.

Le teorie semplici tendono ad essere confermate da risultati sperimentali semplici o, per lo meno, questi ultimi sono facilmente inquadrabili nel sistema.

In immunologia, i ricercatori raccolgono un numero enorme di dati sperimentali, che rimangono avulsi se non riesce a emergere una struttura semplice in cui inquadrali (3).

3) Per esempio "Fundamental Immunology", di W. E. Paul, Ed.. 1984 (1 ° ed.) e 1989 (2 ° ed.) sono raccolte enciclopediche di dati sperimentali. Anche i due capitoli sul network idiotipico, in queste due edizioni, sono raccolte di dati senza alcun tentativo significativo di legarli in una struttura unificatrice dell'immunologia. Sono naturalmente utili come raccolte di esperimenti, ma, per tutto ciò che si è detto, è insufficiente.

Lo scopo fondamentale di una teoria immunologica è di verificare che un sistema, che a prima vista può apparire complesso, in realtà sia costituito da semplici meccanismi variamente regolati dalle leggi biofisiche e matematiche (come ad esempio la struttura elicoidale di una chiocciola altri non è che la ripetizione infinita di una semplice linea spezzata - teoria dei frattali – ndr), secondo un unico algoritmo.

#### b) obiettivi

Una teoria è migliore quando è fornita di un ampio obiettivo di interpretazione, in relazione al livello di complessità dei dati trattati.

In parole povere, la finalità di una teoria è dare significato al maggior numero di fenomeni, anche se non tutti i fenomeni hanno uguale importanza; un'assegnazione oggettiva di un "valore" a ciascuno di questi, può essere complicata.

Caso scolastico sono le quattro equazioni di Maxwell, che insieme descrivono una vasta gamma di fenomeni elettromagnetici. Questo è un esempio di una teoria di grande successo, sia dal punto di vista della semplicità che della portata.

#### c) predittività

Un buon test di una teoria consiste nell'osservare se le sue previsioni possono essere confermate.

Bisogna controllare, tuttavia, poiché più di una teoria può portare a una medesima previsione particolare. La conferma di una previsione, quindi, non dimostra che una teoria sia appropriata. D'altra parte, se un risultato sperimentale è chiaramente in conflitto con le previsioni di una teoria,

questa teoria viene smentita.

È più semplice smentire una teoria, che dimostrarla.

Karl Popper, filosofo della scienza, ha discusso le questioni della conferma e della confutabilità delle teorie scientifiche (4).

4) K. Popper, in "The Logic of Scientific Discovery" 1934, capitolo 1, sezione 6, enuncia:

"Considero un sistema sicuramente empirico o scientifico solo se può essere testato con esperimenti. Queste considerazioni suggeriscono che non è la verificabilità, ma la resistenza alla falsificazione di un sistema che deve essere utilizzata come criterio di discriminazione ... Deve essere possibile che un sistema scientifico possa essere confutato dall'esperienza. "

Egli ha considerato le previsioni che vengono verificate dalla sperimentazione, come tentativi falliti di confutare una teoria.

Le teorie guadagnano credibilità dal fallimento di questi tentativi. D'altra parte, se la previsione di una teoria è altamente specifica (per esempio, se la teoria prevede che una curva sperimentale debba avere una forma particolare e un valore massimo specificato) e questa previsione sia confermata sperimentalmente, siamo abbastanza sicuri che la teoria è esatta.

Diverse ipotesi della teoria della rete simmetrica sono state confermate e non ci sono fallimenti che hanno smentito la teoria. Man mano che la teoria viene sviluppata, emergono ulteriori effetti o meccanismi previsti e questo libro include 18 ipotesi teoriche della rete simmetrica, di cui 3 sono già state confermate.

#### d) risoluzione dei paradossi

Una concezione dominante di come funziona un particolare sistema è chiamata paradigma (ipotesi di lavoro ampiamente accettata o teoria). Gli esperimenti o gli eventi che non si adattano al paradigma prevalente sono particolarmente importanti, perché potrebbero rappresentare il percorso critico per un progresso fondamentale (5).

5) Gli esempi più eclatanti di paradossi che hanno portato a rivoluzioni nella conoscenza scientifica si sono verificati in fisica. La teoria quantistica è stata generata da un conflitto tra aspettative teoriche e misurazioni sperimentali della radiazione del corpo nero.

La Relatività nacque in seguito alla mancata verifica dell'etere come mezzo di propagazione delle onde elettromagnetiche nell'esperimento di Michelson-Morley, un paradosso nel contesto della fisica del XIX secolo.

Tali eventi sono denominati paradossi.

Non possiamo avere un paradosso senza un paradigma accettato da cui si possa prevedere il risultato di un esperimento, e un paradosso esiste solo nel contesto di un tale paradigma accettato.

Un famoso paradosso dell'immunologia cellulare è stato il paradosso I-J, un risultato biologico molecolare che contraddiceva i risultati dell'immunogenetica classica (la genetica del sistema immunitario).

Questo paradosso è emerso nel 1982 (vedi capitolo 13, dove si offre una risoluzione all'interno del paradigma del network immunitario). Le prove sperimentali alla base di un paradosso sono particolarmente importanti (molti immunologi hanno rigettato l'esistenza del paradosso I-J – ndr).

#### e) basi meccanicistiche (biofisiche)

Un modello che simula le proprietà dinamiche di un sistema, ma non è esplicito sui meccanismi che lo regolano, è chiamato un modello fenomenologico. Al contrario, un modello basato su componenti e meccanismi specifici è chiamato un modello meccanicistico.

Un modello con una base meccanicistica è in genere superiore a un modello fenomenologico, poiché facilmente verificabile con i test sperimentali. I modelli fenomenologici sono costrutti astratti (tipicamente costrutti matematici) con le proprietà dinamiche desiderate e possono essere utili come precursori di una teoria meccanicistica in cui le variabili vengono interpretate

esplicitamente in termini di componenti e processi fisici reali.

f) rigore

Possiamo avere il rigore nella misura in cui la sperimentazione richiesta o i postulati della teoria vengono dimostrati e la contestazione sperimentale fallisce, vedi (c). I risultati sperimentali devono essere riproducibili. Dobbiamo essere rigorosi nel ricavare le proprietà del modello dai suoi postulati, che possono derivare dalla modellazione matematica. Ovviamente, maggiore è il rigore, migliore è il modello.

g) robustezza

Se un modello "funziona" (fornisce risultati attesi) solo per un numero molto ristretto di parametri del modello, sorge la domanda se il sistema fisico o biologico che si sta implementando abbia parametri in quell'intervallo preciso. Se funziona su un ampio intervallo di valori solo per un parametro, diciamo che il modello è robusto solo nei confronti di quel parametro.

Se il modello è robusto rispetto a quattro parametri e richiede una quinta variabile per ottenere un risultato ben definito, si crea un'ipotesi da verificare, utile per convalidare il modello.

Testiamo la robustezza di un modello matematico determinando gli intervalli dei parametri che portano ai vari tipi di soluzioni ed effetti attesi tramite il modello progettato. Questi intervalli possono in genere essere determinati anche sperimentalmente.

I valori parametrici misurati sperimentalmente dovrebbero quindi rientrare in tali intervalli. Le non linearità contenute in molti modelli matematici dei sistemi biologici producono modelli che mostrano il comportamento richiesto su un intervallo soddisfacentemente ampio di valori parametrici. In questi casi, anche se sono disponibili solo dati sperimentali limitati, i modelli sono spesso considerati robusti.

h) estetica

L'estetica in molti casi è negli occhi di chi guarda, ma un buon modello o teoria posseggono una eleganza nel costruito molto apprezzata dai ricercatori.

Il fascino estetico di una teoria non è indipendente dai criteri già elencati, in particolare semplicità e finalità. Ad esempio la doppia elica è stata una bella soluzione al problema delle basi molecolari per l'ereditarietà dell'informazione genetica.

## **Due Network**

Nel 1983, al Congresso Internazionale di immunologia a Kyoto, in Giappone, l'immunologo Baruj Benacerraf (Premio Nobel, 1980) dichiarò che la teoria della rete immunitaria si era dimostrata corretta. Nel 1984 Niels Jerne ha ricevuto il premio Nobel, in gran parte per la formulazione dell'ipotesi di una rete immunitaria.

Questo riconoscimento della teoria del network è stato di fondamentale importanza.

A quel tempo un altro tipo di sistema complesso stava tuttavia diventando importante e gli immunologi si trovarono nella posizione di dover scegliere uno dei due sistemi complessi su cui concentrarsi.

Il primo sistema ha a che fare con ciò che è noto come regolazione specifica del sistema immunitario e il secondo con una regolamentazione non specifica.

Era difficile se non impossibile ottenere una sintesi di entrambi questi sistemi complessi.

*La regolazione specifica* (detta anche "regolazione antigene-specifica") comporta cambiamenti nel sistema che influenzano la risposta a una ben determinata molecola denominata "antigene", ossia il sistema si "adatta" all'antigene..

*La regolazione non specifica* riguarda meccanismi regolatori che non comportano discriminazioni nelle varie tipologie di antigeni (self/notself). L'aspetto specifico della regolazione dell'antigene ("immunità adattativa") coinvolge la rete delle regioni V (variabili) che, come gli antigeni, dimostrano una grande variabilità di siti di legame.

La regolazione non specifica coinvolge un sistema di molecole regolatrici solubili chiamate

linfocine e molecole della superficie cellulare chiamate molecole CD, entrambe senza regioni V. Le linfocine e le molecole CD svolgono un ruolo sia nell'immunità adattativa che in una più primitiva forma di immunità, denominata "immunità innata", che non richiede la conoscenza e la memoria quali caratteristiche dell'attività immunitaria.

Dalla metà degli anni '80, gli immunologi sperimentali hanno preferito concentrarsi sulla rete linfocina / CD piuttosto che sulla rete della regione variabile V. La rete della regione V ha continuato a essere studiata da un numero relativamente ristretto di ricercatori.

Alla fine avremo bisogno di studiare sia la rete della regione V che la rete del sistema linfocina / CD e le interazioni tra le due. È diventato chiaro che la rete linfocina / CD da sola non porta a una comprensione chiara e semplice delle complessità dell'immunologia cellulare e molecolare.

Questo testo si concentra sulla rete della regione V (chiamata anche rete idiotipica), ed osserveremo che da questa prospettiva emerge una spiegazione soddisfacente di molti aspetti regolatori specifici del sistema immunitario, con limitati riferimenti alla rete linfocina/CD.

Auspichiamo che una comprensione del sistema completo (rete della regione V più rete linfocina/CD) verrà alla fine raggiunto attraverso una comprensione di base della rete della regione V.

### **Approccio top-down e bottom-up**

Immunologi sperimentali e teorici (6) in genere affrontano lo studio del sistema immunitario in due modi diversi. Gli sperimentatori tradizionalmente hanno un approccio "dal basso verso l'alto bottom-up" per svelare come funzionano i meccanismi biologici.

Ciò significa che cercano prima di conoscere i componenti, quindi determinano in che modo i componenti interagiscono per produrre un sistema funzionante. Un esempio del successo di questo approccio è stata la determinazione della struttura del DNA e il modo in cui la struttura permette una comprensione della genetica. Dalla doppia struttura elicoidale del DNA, con coppie di basi complementari, è stato facile vedere, almeno in linea di principio, come l'informazione genetica è immagazzinata e tradotta in proteine.

6) Le designazioni "sperimentali e teorici" sono scelte per mancanza di termini migliori. Le ipotesi sono ordinariamente formulate e testate da ricercatori sperimentali senza riferimento a teorici professionisti. In altre parole, molti immunologi cellulari sono essi stessi teorici, e in molti casi questo funziona bene. Tuttavia, è necessario un ruolo più ampio per i teorici, che si confrontano sia con il lato sperimentale della disciplina sia con i modelli matematici.

Gli immunologi teorici, i fisici e i chimico-fisici usano tipicamente un approccio "dall'alto verso il basso, top-down". Studiano un sistema nel suo complesso e possono determinare come risponde a piccole perturbazioni o altri stimoli.

Studiano quale sia il set minimo di componenti necessario per produrre i comportamenti osservati, e se non si osservano prove dirette di tali componenti, offrono ipotesi credibili per postulare la loro esistenza. In chimica, questo ha funzionato bene nella formulazione e nello sviluppo della teoria atomica della materia.

La legge delle proporzioni multiple di Dalton ha portato ai postulati dell'esistenza di atomi e molecole. Ad esempio, due moli di idrogeno più una mole di ossigeno reagiscono per formare una mole di acqua (H<sub>2</sub>O). In fisica, i postulati sono costruiti per spiegare le proprietà delle particelle fondamentali in modo estremamente semplice.

Creare un'ipotesi in assenza di prove dirette è un anatema per la maggior parte dei biologi. Quindi non è così sorprendente che la struttura del DNA non sia stata prevista da nessuno che utilizza un approccio top-down, anche se forse sarebbe stato possibile.

La distinzione tra approccio top-down e bottom-up è correlata alla distinzione tra due tipi di dati sperimentali, ovvero dati di componenti di sistema e dati di risposta del sistema.

L'approccio bottom-up si basa principalmente sui dati dei componenti di sistema, mentre l'approccio top-down si basa principalmente sui dati di risposta del sistema.

Un approccio puramente bottom-up sul sistema immunitario non funziona perché esiste un'enorme quantità di dati sperimentali già disponibili e quindi il problema centrale è determinare quali dati



sono di fondamentale importanza per la comprensione del sistema. È stato stimato che le scienze immunologiche consistono in oltre un milione di dati fra esperimenti e postulati.

Si stima che vengano pubblicati 8000 o più documenti all'anno, contenenti una media di 5 o più elementi di visualizzazione (figure o tabelle). Ogni oggetto di visualizzazione fa una sintesi specifica, che riflette un dato sperimentale o un postulato.

Ciò significa che vengono pubblicati più di 40.000 dati o postulati all'anno, e dopo venticinque anni i ricercatori hanno un milione di questi eventi a disposizione. Inutile dire che la stragrande maggioranza di questa massa di conoscenze difficilmente vengono a contatto o memorizzate dalla comunità degli immunologi.

I dati discussi in questo testo sono selezionati in base alla loro rilevanza per una comprensione dell'immunologia nel contesto della teoria del network simmetrico immunitario. E' evidente che una teoria della rete si basa su un piccolo numero di postulati, in rapporto a quelli che sono considerati i dati più importanti. Comunque la teoria deve essere in grado di spiegare gran parte di ciò che conosciamo circa il funzionamento del sistema.

Lo sviluppo della teoria della rete simmetrica ha utilizzato entrambi gli approcci top-down e bottom-up.

La teoria illustra come una comprensione dei dati di risposta di sistema (top-down) può essere correlata ai dati dei componenti di sistema (bottom-up).

Anche se è vi è stato un notevole progresso a tal fine, c'è una grande quantità di informazioni disponibili, che non è stata trattata nel contesto della teoria della rete.

La misura in cui la teoria sarà confermata è strettamente correlata alla misura in cui le numerose previsioni teoriche possono essere validate.

## CAPITOLO II

### La figura dell'immunologo sperimentale

Sul versante opposto si colloca la maggioranza dei ricercatori e scienziati che lavorano nella sperimentazione immunologica.

Fra di essi io ho avuto la fortuna e l'onore, a metà degli anni '90, di conoscere il prof. Antonio Lanzavecchia, che si occupava di vaccini e di memoria immunitaria.

All'epoca era stato intervistato da "Le Scienze" per le sue ricerche poiché, insieme a pochi altri ricercatori, era riuscito ad individuare ed isolare alcune cellule della memoria e ad allestire un protocollo di valutazione della loro sopravvivenza dopo adeguato stimolo antigenico.

Il giornale formulò l'ipotesi che la dimostrazione della esistenza di cellule della memoria perenni, avrebbe procurato il Nobel al prof. Lanzavecchia.

In quel periodo Antonio Lanzavecchia venne invitato a Milano ad esporre le sue teorie ed i risultati ottenuti.

Illustrò il suo protocollo, con cui le cellule sopravvivevano alcune decine di giorni, rimanendo in grado di sviluppare una risposta anamnestică e l'obiettivo finale delle sue ricerche era quello di riuscire a conoscere i meccanismi di "prolungamento indefinito" della sopravvivenza di queste cellule.

Dopo la conferenza, molte domande di natura tecnica ed una sola contestazione sulla impostazione teorica, da parte di 2 persone (compreso me) che contestavano la teoria delle cellule di memoria perenni. Mi aspettavo una lapidazione o perlomeno un coro di fischi, invece fu lo stesso Lanzavecchia a dire che questa era la sfida delle sue ricerche, anche se riconosceva che alcuni meccanismi "ambientali" e "dinamici" considerati da altre teorie della memoria potevano essere tranquillamente presenti ed operanti anche in un sistema che consenta lo sviluppo delle cellule di memoria a lunga vita.

Questa eventualità, il professore Lanzavecchia probabilmente non l'ha mai esclusa, visto che ne fa menzione nel lavoro che segue questa prefazione, in particolare nel paragrafo della sopravvivenza delle cellule di memoria (riportato in corsivo).

Antonio Lanzavecchia nel 1999 ha assunto la carica di direttore dell'Istituto di Ricerche in Biomedicina di Bellinzona, di cui era cofondatore, e dal 2009 professore di Immunologia Umana presso lo Swiss Federal Institute of Technology (ETH) di Zurigo.

Temi principali delle sue ricerche sono stati alcuni aspetti centrali dell'immunologia come l'attivazione dei linfociti T e B, la memoria immunologica e la classificazione di due sottopopolazioni di cellule T, "effector memory" e "central memory" divenute un paradigma per la definizione delle basi cellulari della memoria immunologica.

Recentemente il professor Lanzavecchia ha contribuito alla messa a punto di anticorpi monoclonali da cellule di memoria B e plasmacellule.

Il lavoro che proponiamo alla vs attenzione è una illustrazione dello stato dell'arte su "memoria e vaccini", articolo di tipo divulgativo, e pertanto di facile lettura anche per chi non si occupa principalmente di sperimentazione immunologica.

### Brevi riflessioni sui vaccini e sulla memoria immunitaria

Federica Sallusto 1, Antonio Lanzavecchia 1,2, Koichi Araki 3, Rafi Ahmed 3

- 1) Institute for Research in Biomedicine, CH-6500 Bellinzona, Switzerland
- 2) Institute of Microbiology, ETH Zurich, CH-8093 Zurich, Switzerland
- 3) Emory Vaccine Center, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA

[Immunity - Volume 33, Issue 4 October 29, 2010](#)

### Riassunto

I vaccini agiscono stimolando una risposta immunitaria e la conseguente memoria immunologica che crea una duratura protezione da infezioni o malattie. Recentemente sono stati sviluppati nuovi

metodi per indagare in profondità la risposta immunitaria negli animali di laboratorio e negli esseri umani per una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che controllano la differenziazione e il mantenimento delle cellule T e B di memoria.

In questa recensione viene fornita una panoramica sull'organizzazione cellulare della memoria immunitaria e sono sottolineate alcune delle questioni in sospeso sulla memoria immunologica e come queste influiscono sulle strategie di vaccinazione. Infine si discute su quanto si può apprendere sulla progettazione degli antigeni vaccinali, osservando le nostre cellule T e B di memoria: in pratica un viaggio dai vaccini alla memoria e ritorno.

## **Introduzione**

La memoria immunitaria è la capacità del sistema immunitario di rispondere con maggiore efficacia ad un ripetuto contatto con lo stesso agente patogeno e costituisce la base per la vaccinazione ([Ahmed and Gray, 1996](#)).

In effetti, il concetto di vaccinazione è nato diverse centinaia di anni fa da osservazioni storiche, risalenti al 400 AC, che gli individui sopravvissuti a una malattia raramente subivano una seria ricaduta una seconda volta ([Finley Jr, 1951](#); [Plotkin and Plotkin, 2008](#)).

I primi tentativi di immunizzazione in Europa si sono verificati nel 16° secolo quando il processo di variolizzazione è stato usato per prevenire il vaiolo ([Plotkin e Plotkin, 2008](#)).

Si praticava l'iniezione di pustole di vaiolo da un paziente infetto in individui sani.

Questi primi tentativi di immunizzazione pre-datano qualsiasi conoscenza sulla microbiologia e l'immunologia. Il principale passo avanti nella vaccinazione fu compiuto nel 1796, quando Jenner usò materiale da vaiolo vaccino contro il vaiolo umano. Vale la pena notare che in questa intuizione fondamentale di Jenner era insito il concetto di memoria poiché aveva osservato che i mungitori che avevano contratto il vaiolo bovino erano risparmiati dalle devastazioni del vaiolo ([Janeway et al., 2005](#); [Plotkin and Plotkin, 2008](#)).

La vaccinazione rimane il metodo più efficace per prevenire le malattie infettive e rappresenta uno dei contributi più rilevanti dell'immunologia alla salute umana ([Plotkin and Plotkin, 2008](#); [Siegrist, 2008](#)). Il successo dei vaccini contro la poliomielite, il vaiolo, il morbillo, la difterite, il tetano, la rabbia, ecc., dimostra il potenziale di questo approccio nel ridurre l'onere globale delle malattie infettive e, nel caso del vaiolo, di sradicare completamente un flagello mondiale ([Breman e Arita, 1980](#), [WHO, 1980](#)).

Tuttavia, nonostante questi notevoli successi ci sono ancora grandi sfide da affrontare, come lo sviluppo dei vaccini contro importanti patogeni umani come HIV, Mycobacterium tuberculosis, Plasmodium falciparum, HCV, RSV e virus della dengue ([Hall, 2001](#); [Hill, 2006](#); [Houghton and Abrignani, 2005](#); [Johnston and Fauci, 2007](#); [Langhorne et al., 2008](#); [McMichael et al., 2010](#); [Skeiky and Sadoff, 2006](#); [Walker and Burton, 2008](#); [Whitehead et al. 2007](#)). Infine, un obiettivo attuale sono le nuove tecniche, spesso legate ai monoclonali o alla manipolazione di alcuni meccanismi immunitari o ai vaccini per combattere il cancro e le malattie autoimmuni e rappresentano una nuova interessante area di ricerca e sviluppo ([Larche and Wraith, 2005](#); [Lollini et al. 2006](#); [Melief and van der Burg, 2008](#)).

In questa recensione si esaminano gli studi sulla memoria immunologica, che valutano l'intensità, la qualità e la specificità della risposta immunitaria, e forniscono un approccio razionale allo sviluppo di un vaccino.

Di conseguenza, questo articolo è diviso in tre sezioni: nella prima parte forniremo una panoramica dell'organizzazione cellulare della memoria immunitaria; nella seconda parte considereremo alcune delle questioni in sospeso sulla memoria immunologica e l'immunità protettiva e su come influiscono sulle strategie di vaccinazione; e nell'ultima sezione discuteremo di quello che abbiamo appreso dalle nostre cellule T e B di memoria.

## **Organizzazione cellulare della memoria immunologica**

### **Divisione del lavoro fra le cellule di memoria**

Le cellule T e B di memoria rappresentano la progenie di cellule naïve specifiche per l'antigene che

hanno subito una selezione ed espansione clonale nel corso della risposta immunitaria e sopravvivono dopo la eliminazione dell'antigene.

Le cellule di memoria conferiscono protezione immediata e generano risposte secondarie più rapide e di maggiore ampiezza rispetto alle risposte primarie (Tabella 1).

**Tabella 1**  
1<sup>^</sup> e 2<sup>^</sup> linea dell'immunità acquisita contro un patogeno

	<b>I linea</b>	<b>II linea</b>
<b>Attori centrali</b>	Anticorpi (IgA, IgG) Linf. TEM (cellule T delle memoria, effettrici)	Cellule B di memoria Linf. TCM (cellule T di memoria, centrale)
<b>Localizzazione degli attori centrali</b>	Punto di accesso del patogeno (intestino, vie respiratorie, vie urogenitali, etc...	Tessuti linfoidei (stazioni linfatiche locali)
<b>Protezione</b>	immediata	Ritardata Le cellule di memoria nei tessuti linfoidei si attivano rapidamente. Tuttavia la capacità di protezione immediata è limitata in relazione al tempo necessario per intervenire nel sito di infezione
<b>Risposta secondaria o anamnestic</b>	Minima, non significativa	Espansione clonale differenziazione in cellule effettrici e plasmacellule. Migrazione in vari tessuti, non solo nel sito di infezione

Nel sistema delle cellule B la protezione immediata è fornita da plasmacellule a lunga vita presenti nel midollo osseo e che secernono anticorpi in assenza dell'antigene, mantenendo così una loro concentrazione costante nel siero e nei fluidi corporei (Radbruch et al., 2006); la risposta secondaria è mediata dalle cellule B di memoria che proliferano rapidamente e si differenziano in risposta alla stimolazione, generando una nuova generazione di plasmacellule e un innalzamento marcato ma transitorio degli anticorpi sierici.

Una simile divisione del lavoro si applica al sistema delle cellule T (Sallusto et al., 2004). La protezione immediata è conferita dalle cellule T di memoria effettrici circolanti o tissutali (TEM) che controllano la presenza di patogeni nelle barriere esterne e nei tessuti malati e avviano una funzione effettrice immediata dopo il riconoscimento dell'antigene. Le risposte secondarie sono mediate dalle cellule T di memoria centrale (TCM) che pattugliano le aree occupate dalle cellule T nei tessuti linfoidei secondari dove possono proliferare rapidamente in risposta agli antigeni presentati dalle cellule dendritiche (DC).

Questa divisione del lavoro ha implicazioni per le strategie di vaccinazione poiché la protezione dall'infezione può basarsi su entrambi i meccanismi a seconda della natura dell'agente patogeno, delle dimensioni e della sua localizzazione. Ad esempio, anticorpi già presenti e plasmacellule a lunga vita sono necessari per neutralizzare le tossine o prevenire l'infezione di un virus al suo ingresso, mentre le risposte secondarie mediate dalle cellule TCM e B di memoria possono essere sufficienti per proteggersi dai virus che hanno tempi di incubazione lunghi (Plotkin et al., 2008).

### **Dalle T naive alle T di memoria**

La qualità e la quantità di cellule T di memoria viene impostata durante le risposte immunitarie primarie stimulate in modo peculiare dal tipo di antigene e che vengono avviate nelle aree delle

cellule T degli organi linfoidi secondari. Qui le rare cellule T naïve specifiche sono stimulate dall'antigene presentato dalla DC (cellula dendritica) attivata. Gli agenti patogeni possono attivare la DC innescando più recettori innati direttamente tramite recettori associati al patogeno (PAMPS) o indirettamente tramite recettori associati al danno (DAMPS, come ad esempio l'acido urico e l'ATP extracellulare) che portano a una presentazione dell'antigene più potente, alla costimolazione e alla produzione di citochine che polarizzano la risposta (Iwasaki e Medzhitov, 2010).

È la natura e la combinazione dei recettori innati innescati sulle DC che determinano la loro capacità di regolare la stimolazione di alcune tipologie di cellule T (Reiner et al., 2007). In risposta a determinati virus e patogeni intracellulari, la DC produce IL-12, che promuove la differenziazione delle cellule Th1 in grado di produrre IFN- $\gamma$  efficace contro tali patogeni (Macatonia et al., 1995).

Allo stesso modo, in risposta a funghi o ad alcuni batteri, le DC e i monociti producono IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 che guidano la differenziazione delle cellule Th17 che con la secrezione di IL-17 e il reclutamento di neutrofili proteggono da agenti patogeni extracellulari (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

La natura protettiva di queste risposte polarizzate è sottolineata da studi sulle immunodeficienze umane, in cui i pazienti con risposte Th1 o Th17 difettose soffrono rispettivamente di infezioni micobatteriche o fungine (Ma et al., 2008; Milner et al., 2008).

Un percorso più complesso innescato da elminti o allergeni, che coinvolge cellule epiteliali e cellule helper innate o naturali produttrici di IL-4 sembra controllare l'induzione di cellule Th2 che producono IL-4, IL-5 e IL-13 e mediare meccanismi di protezione o allergia (Coffman, 2010).

Altri sottogruppi di cellule T helper effettrici (e di memoria) sono stati recentemente caratterizzati in topi e umani, come Th9 (Veldhoen et al., 2008) e Th22 (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009) che possono essere coinvolti rispettivamente in allergia e difesa cutanea. Le cellule T CD4<sup>+</sup> non solo agiscono direttamente per promuovere diversi tipi di risposte infiammatorie nei tessuti, ma svolgono anche un ruolo essenziale nelle risposte delle cellule T CD8<sup>+</sup> e delle cellule B.

Un sottogruppo specifico di cellule T helper follicolari (TFH) è richiesto per l'induzione delle reazioni del centro germinativo che porta alla differenziazione delle cellule B di memoria e delle plasmacellule a vita lunga che producono anticorpi ad alta affinità dell'isotipo attivato (Vinuesa et al., 2005). Le cellule TFH producono IL-21 e la loro differenziazione dipende da Bcl-6 (Kassiotis e O'Garra, 2009) e da un'interazione ad alta avidità con cellule B specifiche per l'antigene (Fazilleau et al., 2009; Qi et al., 2008).

Le cellule T helper possono anche promuovere la maturazione delle DC attraverso l'interazione CD40L-CD40 e in questo modo stimolare la generazione di cellule T CD8<sup>+</sup> effettrici e di memoria contro antigeni scarsamente immunogenici come gli antigeni proteici (Lanzavecchia, 1998).

Nel contesto della progettazione di un vaccino, studi più dettagliati dovrebbero mirare a definire da un lato il modello di espressione dei recettori innati nei topi e negli esseri umani, dall'altro le citochine e gli stimoli che guidano la differenziazione di diversi sottogruppi di cellule T effettrici.

La qualità della risposta delle cellule T è profondamente influenzata non solo da PAMPs e DAMPs ma anche dalla natura della DC che presentano l'antigene e dal microambiente tissutale in cui ha luogo la risposta delle cellule T. Un sottogruppo distinto di CD8 $\alpha$ -DC murino può elaborare e presentare antigeni esogeni su molecole MHC di classe I e innescare risposte CTL (Heath e Carbone, 2009). Alcune DC con proprietà simili sono state recentemente descritte negli esseri umani (Villadangos and Shortman, 2010).

Le DC intestinali e cutanee possono generare l'espressione dei recettori homing della pelle e dell'intestino, come CCR9 o CCR10, nella differenziazione delle cellule T (Sigmundsdottir and Butcher, 2008). I monociti rappresentano una popolazione abbondante ed eterogenea di cellule circolanti che possono essere rapidamente reclutate verso i siti di infiammazione e risposta immunitaria dove si differenziano in DC (Auffray et al., 2009).

L'importanza degli studi che affrontano il ruolo dei diversi sottogruppi di DC e monociti nelle risposte delle cellule T non può essere sopravvalutata nell'ottica di poter indirizzare antigeni e vaccini verso diversi tipi di cellule in vivo (Bonifaz et al., 2004; Kamphorst et al., 2010).

## **Cellule B e risposta anticorpale**

La risposta delle cellule B agli antigeni proteici è un processo che viene avviato al confine tra le aree delle cellule T e B, dove le cellule T, innescate da cellule DC presentanti l'antigene, entrano in contatto con B specifiche che hanno catturato e processato l'antigene nativo rilasciato dai macrofagi che rivestono il seno sottocapsulare (Phan et al., 2009). L'interazione T-B specifica per l'antigene porta ad una rapida espansione e differenziazione delle cellule B in plasmacellule a vita breve che producono anticorpi IgM.

Questa risposta extrafollicolare è seguita dalla reazione al centro germinativo dove le cellule TFH e l'antigene intrappolato nella rete delle cellule follicolari dendritiche (FDC) guidano la proliferazione, il cambiamento isotipico e la maturazione dell'affinità delle cellule B antigene-specifiche ed infine alla generazione di cellule B di memoria e plasmacellule a lunga vita che producono anticorpi ad alta affinità, mutati somaticamente, per cambio isotipico (Allen et al., 2007). La durata della reazione del centro germinativo può variare a seconda della natura dell'antigene e può durare per diverse settimane o mesi, il che implica che gli anticorpi ad alta affinità e le cellule di memoria possono essere generati con efficienza dopo l'eliminazione del patogeno (Dogan et al., 2009).

A differenza degli antigeni proteici che provocano la risposta delle cellule B T-dipendenti, i polisaccaridi batterici innescano la risposta di cellule B T-indipendenti che determinano la generazione di plasmacellule a vita breve, senza cellule di memoria.

Stimolazioni ripetute con polisaccaridi possono portare a una riduzione progressiva della risposta e forse esaurire le cellule B specifiche (Pollard et al., 2009).

Al contrario, gli stessi polisaccaridi coniugati ad antigeni proteici provocano una risposta delle cellule B T-dipendenti e la formazione di cellule B di memoria efficacemente stimolate dallo stesso glicoconiugato. Questo approccio è stato usato con successo per sviluppare vaccini coniugati altamente efficaci contro pneumococco e meningococco (Plotkin e Plotkin, 2008).

Nell'uomo una grande frazione di cellule B circolanti è IgM<sup>+</sup> e possiede geni Ig mutati somaticamente. Attualmente non è chiaro se queste cellule rappresentino un equivalente circolante delle cellule B della zona marginale nel topo che rispondono agli agenti patogeni nel sangue o una generica popolazione di cellule di memoria (Seifert and Kuppers, 2009; Weill et al., 2009). Recentemente, utilizzando un modello murino di cellule B di memoria AID-dipendenti (AID: citidina-deaminasi indotta da attivazione) marcate, è stato dimostrato che la memoria delle cellule B appare nelle cellule IgM<sup>+</sup> e IgG1<sup>+</sup> che si trovano sia nei centri germinativi che al di fuori dei follicoli. Dopo l'attivazione, il sottogruppo IgG si è differenziato in plasmacellule, mentre il sottogruppo IgM ha reiniziato una reazione nel centro germinativo, suggerendo una suddivisione dei compiti come per le cellule TEM e le TCM (Dogan et al., 2009).

Questi risultati, una volta riscontrati nel sistema umano, avranno importanti implicazioni per il monitoraggio della vaccinazione attraverso la distinzione delle risposte anticorpali immediate dalle risposte secondarie dipendenti dal centro germinativo.

## **Sopravvivenza delle cellule di memoria**

Solo una piccola frazione delle cellule clonate al picco della risposta immunitaria sopravvive come cellule di memoria. Nei topi i precursori delle cellule T CD8 di memoria potrebbero essere identificati come cellule IL-7R<sup>hi</sup>, mentre le cellule KLRG1<sup>hi</sup>, più abbondanti, hanno dimostrato di rappresentare cellule effettrici di breve durata (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003; Kaech and Wherry, 2007; Sarkar et al., 2008).

Sembra che il rapporto tra effettori e precursori della memoria sia determinato dall'espressione differenziata dei fattori di trascrizione, come T-bet e Eomesodermin (Tbr2), che a loro volta dipendono dalla forza della stimolazione da parte dell'antigene, del segnale delle citochine e del Wnt (Gattinoni et al., 2009; Intlekofer et al., 2005).

Usando metodi per analizzare la progenie di singole cellule è stato recentemente dimostrato che all'interno di un singolo clone le cellule T possono andare incontro a un diverso destino, con maturazione in diversi tipi di effettori e cellule di memoria, e che singole cellule T naive che

esprimono un TCR ad alta o bassa avidità producono entrambi cellule T effettrici e di memoria (Gerlach et al., 2010; Stemberger et al., 2007).

Le cellule di memoria T e B così come le plasmacellule a lunga vita possono essere mantenute in numero relativamente costante per quasi tutta la vita in assenza dell'antigene specifico. La loro sopravvivenza dipende da citochine esogene che determinano la dimensione del pool di memoria. Per le cellule T di memoria CD4+ e CD8+ le citochine per la sopravvivenza sono IL-7 e IL-15 che mantengono queste cellule in uno stato di proliferazione lenta ma continua (Surh and Sprent, 2008). Le cellule B di memoria si dividono anch'esse a bassa frequenza ma non è stata ancora identificata una citochina di mantenimento, mentre è stato dimostrato che sono necessari un BCR intatto e una fosfolipasi C $\gamma$ 2 per mantenere vita e funzione a lungo termine (Hikida et al., 2009). Al contrario, le plasmacellule a lunga vita sopravvivono senza dividersi in nicchie del midollo osseo a stretto contatto di cellule stromali che forniscono, in associazione con altre cellule, citochine di sopravvivenza come IL-6 e APRIL (Radbruch et al., 2006).

A differenza delle cellule T di memoria che elaborano le loro citochine solo in risposta alla stimolazione antigenica, le plasmacellule a lunga vita producono continuamente anticorpi mantenendo così i livelli sierici costanti. Il midollo osseo contiene anche cellule T di memoria CD4+ e CD8+ che possono ricircolare (Di Rosa e Pabst, 2005), nonché una popolazione, descritta recentemente, di cellule T di memoria sessile a riposo che occupa una nicchia distinta a contatto con cellule stromali produttrici di IL-7 (Tokoyoda et al., 2009).

Il fatto che cellule di memoria effettrici mature come le cellule TEM e le plasmacellule non abbiano alcuna capacità proliferativa e di ricostituzione del pool ha condotto all'ipotesi che il mantenimento a lungo termine delle cellule di memoria dipenda dalle cellule che mantengono la capacità proliferativa, come le cellule TCM e B oppure un sottoinsieme specializzato di "cellule staminali di memoria" (Lanzavecchia e Sallusto, 2002, Fearon et al, 2001).

Nel caso delle cellule T questo modello è supportato dalla dimostrazione che la capacità di ricostituzione a lungo termine è caratteristica delle cellule TCM piuttosto che delle TEM (Wherry et al., 2003) e dal potenziale futuro isolamento di una ipotetica cellula staminale di memoria (Gattinoni et al., 2009; Turtle et al., 2009).

Recenti studi hanno identificato vie di stimolo che sembrano coinvolte nella differenziazione delle cellule staminali di memoria così come farmaci che favoriscono la generazione di cellule TCM (Araki et al., 2009; Gattinoni et al., 2009; Pearce et al., 2009).

C'è stato un ampio dibattito sul ruolo dell'antigene nel mantenimento della memoria, ma ora è chiaro dagli esperimenti di trasferimento cellulare effettuati tramite una varietà di sistemi, che le cellule T e B di memoria possono persistere in assenza di antigene (Gray, 2002; Hou et al., 1994; Lau et al., 1994; Zinkernagel, 2003).

Questi risultati sono stati ulteriormente avallati, dimostrando che le cellule T di memoria possono persistere anche in assenza delle molecole MHC di restrizione (Murali-Krishna et al., 1999; Swain et al., 1999).

*Tuttavia, la persistenza antigenica nei centri germinali gioca un ruolo importante nella selezione e maturazione della risposta delle cellule B e ci sono dati che suggeriscono che i complessi antigene-anticorpo possono persistere sulle cellule follicolari dendritiche per lunghi periodi di tempo e pertanto l'antigene può giocare un ruolo nella organizzazione del repertorio delle cellule B (Chen et al., 1978; Tew et al., 1980).*

È interessante notare che alti livelli di antigeni solubili sostenuti per molto tempo possono portare all'induzione della tolleranza o all'esaurimento di cellule T e B. Nel caso di alcune infezioni virali croniche, le cellule T e B specifiche per l'antigene esprimono una varietà di recettori inibitori che determinano l'esaurimento funzionale delle medesime cellule (Barber et al., 2006; Virgin et al., 2009; Wherry et al., 2007).

### **Genomica della differenziazione delle cellule T e B di memoria**

Nell'ultimo decennio c'è stato un notevole interesse nel definire i profili di espressione genica globale delle cellule T e B di memoria (Haining e Wherry, 2010; Kaech and Wherry, 2007; Staal

and Clevers, 2005). Questo approccio ha generato molte informazioni poiché ha fornito una visione imparziale su tutti i geni che sono iperespressi o inibiti durante la differenziazione verso la memoria. Particolarmente importanti gli studi sull'analisi genomica integrativa delle cellule T specifiche per l'antigene mentre effettuano la transizione da naive a effettrice e di memoria (Kaech et al., 2002).

Tali studi longitudinali non solo hanno identificato geni chiave (fattori di trascrizione, molecole di sopravvivenza, recettori di citochine e chemochine, e molecole di segnalazione e **homing**, ecc.) che sono differenzialmente espressi tra cellule T naive e di memoria ma hanno anche fornito informazioni sui meccanismi di formazione della memoria e le differenze fra le cellule T effettrici e di memoria. La profilazione genica ha anche fornito informazioni sui meccanismi di disfunzione delle cellule T durante le infezioni croniche e hanno identificato i recettori inibitori principali espressi sulle cellule T virus specifiche, rese anergiche (Barber et al., 2006; Wherry et al., 2007).

Le cellule naive B possono differenziarsi direttamente in plasmacellule a vita breve o passare attraverso una rigenerazione nel centro germinale per diventare cellule B di memoria o plasmacellule a vita lunga. I pattern di espressione genica associati a queste transizioni sono stati analizzati da diversi gruppi tramite DNA microarrays (Good-Jacobson e Shlomchik, 2010).

La differenziazione di una cellula B naive in una cellula B del centro germinale o una plasmacellula è accompagnata da importanti cambiamenti nella regolazione genica, pilotati dai fattori di trascrizione master Bcl-6 e blimp-1. Non si conoscono bene le differenze di espressione genica che distinguono le plasmacellule da corta a lunga vita.

Le caratteristiche di espressione genica delle plasmacellule a vita lunga isolate dal midollo osseo umano sono state recentemente confrontate con quelle delle plasmacellule a vita breve ottenute dalla stimolazione in vitro di cellule B di memoria (Jourdan et al., 2009).

Questo studio ha mostrato che le plasmacellule del midollo osseo mostrano una ridotta espressione della molecola proapoptotica Fas e un rallentamento delle molecole coinvolte nel traffico dei linfociti come CD62L e S1PR1. Pertanto, sembra che le plasmacellule del midollo osseo mostrino resistenza all'apoptosi e una ridotta capacità di migrazione verso altri siti anatomici. Saranno necessari studi più dettagliati che definiscono le caratteristiche delle plasmacellule a vita lunga rispetto a quelle a vita breve per lo sviluppo di vaccini che inducono immunità umorale a lungo termine.

### ***Quesiti particolari su memoria immunologica e vaccinazione:***

Nella sezione precedente abbiamo fornito una panoramica dell'organizzazione cellulare della memoria immunologica.

Considereremo alcune questioni chiave sulla memoria e l'immunità protettiva e su come influiscono sullo sviluppo della prossima generazione di vaccini.

I nostri notevoli successi nei vaccini sono venuti principalmente contro le infezioni acute causate da agenti patogeni stabili (Plotkin et al., 2008).

Tuttavia, mancano vaccini efficaci contro i patogeni con alta frequenza di mutanti o che causano infezioni persistenti e latenti come HIV, HCV e M. tuberculosis (Houghton and Abrignani, 2005; Johnston and Fauci, 2007; McMichael et al., 2010; Skeiky e Sadoff, 2006; Walker e Burton, 2008).

Si è anche dimostrato difficile sviluppare vaccini efficaci contro infezioni acute come RSV e malaria, in cui l'infezione naturale di per sé non fornisce una protezione completa contro la re-infezione (Hall, 2001; Hill, 2006); Langhorne et al., 2008).

Lo sviluppo di vaccini efficaci contro queste importanti malattie umane presenta una serie unica di sfide per ciascun agente patogeno. Tuttavia, ci sono anche concetti fondamentali sulla memoria immunitaria e la vaccinazione, che accomunano i diversi patogeni, e verranno trattati brevemente e in generale sull'immunità protettiva e sono correlati all'efficacia del vaccino.



## **Protezione immunitaria e correlazione con l'efficacia di un vaccino**

C'è stato un notevole interesse e dibattito nel determinare l'importanza delle risposte delle cellule T e B nell'immunità protettiva ([Ahmed and Gray, 1996](#); [Ahmed et al., 2007](#); [Appay et al., 2008](#)). Nell'esaminare questo problema, è necessario ricordare che gli anticorpi e le cellule T si sono evoluti per svolgere funzioni distinte.

La funzione degli anticorpi è di danneggiare il microbo stesso (virus in soluzione, batteri e parassiti), mentre le cellule T attaccano le cellule infette. Poiché le cellule T sono in grado di riconoscere gli antigeni microbici solo in associazione con le molecole MHC dell'ospite, i virus o i batteri liberi sono invisibili ad esse.

Pertanto, l'anticorpo costituisce la nostra unica difesa specifica contro gli organismi microbici liberi, e l'importanza dell'anticorpo preesistente nell'immunità protettiva contro le malattie infettive è fondamentale. In effetti, è probabile che l'anticorpo sia l'unico meccanismo di immunità protettiva contro batteri e parassiti ad attività esclusivamente extracellulare.

In queste situazioni, è relativamente facile determinare una correlazione di efficacia del vaccino in base ai livelli di anticorpi sierici stimolati contro il patogeno o la tossina ([Siegrist, 2008](#)). Tuttavia, questa equazione non è applicabile a virus, batteri e parassiti che possono sopravvivere o replicarsi intracellularmente.

Sebbene l'anticorpo rappresenti ancora la prima linea di difesa contro tali infezioni e i test sul livello di anticorpi specifici siano usati come correlati all'efficacia del vaccino per diversi virus come il virus dell'influenza e il virus della febbre gialla ([Siegrist, 2008](#)), ci sono spesso situazioni in cui una significativa quota di virus non è neutralizzata o opsonizzata dall'anticorpo stimolato dal vaccino.

A questo punto entrano in gioco le cellule T uccidendo la cellula infetta e/o rilasciando citochine che inibiscono la crescita del microbo o compromettono la capacità del patogeno di sopravvivere all'interno della cellula. Ad esempio, la immunizzazione specifica di cellule T è un metodo più accurato per l'efficacia di un vaccino zoster ([Levin, 2008](#)).

Definire le correlazioni di efficacia del vaccino contro i patogeni altamente mutevoli sarà molto più difficile in quanto il meccanismo di immunità protettiva può variare a seconda del ceppo virale a cui l'individuo è esposto. È probabile che saranno necessari nuovi approcci per definire queste correlazioni: il metodo tradizionale di utilizzare un singolo parametro per determinare l'efficacia del vaccino semplicemente non funzionerà nei casi più difficili.

Vi è una notevole convergenza alla prospettiva di utilizzare approcci biologici più complessi per definire l'efficacia del vaccino ([vedi revisione di Pulendran et al. - Immunity vol.33-2010](#)). Tuttavia, anche questo di per sé potrebbe non essere sufficiente e forse la soluzione sta nel combinare gli approcci della biologia dei sistemi con metodi più innovativi per valutare non solo la quantità ma anche la qualità delle risposte delle cellule T e B della memoria.

## **Quante cellule di memoria possiamo produrre e mantenere (problemi di competizione e spazio)**

Una delle cose più affascinanti del sistema immunitario è la capacità dei linfociti di regolare il numero ([Takada e Jameson, 2009](#)). Questa regolazione omeostatica è abbastanza specifica per il tipo di cellule; le cellule B si "autoregolano" e c'è anche specificità nel conteggio delle cellule T CD4+ contro le CD8+. Ad esempio, se le cellule T CD4+ sono diminuite, vi è un'espansione selettiva di cellule T CD4+ e non di CD8+ per ristabilire il compartimento e viceversa. Il meccanismo non è noto, ma la capacità del sistema immunitario di avere un sistema di omeostasi ha importanti implicazioni per la vaccinazione.

L'esperienza convenzionale asserisce che le dimensioni del sistema immunitario, incluso il numero di cellule di memoria, sono fisse e che quando nuove cellule di memoria sono generate da un'infezione o da vaccinazione, ci deve essere una diminuzione di cellule di memoria preesistenti per mantenere una omeostasi ([Freitas e Rocha, 2000](#); [Goldrath, 2002](#); [Welsh et al., 2010](#)).

In linea di principio, ciò è corretto, ma non è noto come quantificare questo limite e quanta flessibilità esista nell'implementare nuove cellule di memoria. Uno studio recente ha affrontato questo problema critico e ha dimostrato che le dimensioni del pool totale di cellule T CD8+ di

memoria nei topi possono quasi raddoppiare per accogliere nuovi elementi con un danno minimo alle cellule di memoria preesistenti (Vezys et al., 2009).

È interessante notare che questo aumento si è verificato quasi esclusivamente nelle cellule T di memoria effettrici suggerendo che questo sottogruppo di cellule T di memoria si adatta nell'ospite in base ai contatti immunologici. In questo contesto vale la pena notare che un gran numero di cellule T CD8+ di memoria effettrici specifiche per HCMV ed EBV si accumulano nel tempo, nell'uomo (Klenerman and Hill, 2005). In alcuni casi questo aumento è così sorprendente che le cellule T specifiche per un singolo epitopo HCMV possono rappresentare fino al 20% della risposta totale delle cellule T CD8+.

È ben documentato dagli studi condotti sia su topi che su esseri umani che la percentuale di cellule T naive diminuisce con l'età, mentre la percentuale di cellule T di memoria aumenta (Linton and Dorshkind, 2004; Nikolich-Zugich, 2008).

Si presume che questa inversione del rapporto tra cellule T naive e memoria sia interamente dovuta alla perdita di cellule T naive che riflettono la diminuzione della produzione timica in funzione dell'età. Tuttavia, non è stato rigorosamente escluso che questo cambiamento osservato nel rapporto sia anche dovuto ad un aumento del numero di cellule T di memoria a seguito del cumulo di contatti immunologici nel tempo.

Questo problema deve essere affrontato in dettaglio quantificando il numero di cellule T di memoria nei tessuti linfoidi e non-linfoidi utilizzando modelli murini e di primati non umani. Un'altra domanda importante che merita attenzione è quella di determinare se vi è qualche sistema omeostatico di controllo tra cellule T naive e di memoria.

In altri termini, il nostro sistema immunitario controlla il numero totale di linfociti T indipendentemente dal fatto che siano naive o di memoria e che siano regolate insieme o indipendentemente. La comprensione di questi problemi ha implicazioni significative per la progettazione di nuove formulazioni di vaccini.

Il sistema delle cellule B è anch'esso sotto controllo omeostatico e ci sono meccanismi per regolare il numero delle cellule B naive e di memoria, nonché i livelli totali di immunoglobuline nel siero (Nimmerjahn e Ravetch, 2008; Sanz et al., 2008).

È necessaria una migliore comprensione dei meccanismi regolatori implicati.

In particolare, è fondamentale la questione dell'omeostasi delle plasmacellule per l'immunità protettiva indotta da un vaccino. Gli anticorpi indotti da vaccino possono essere mantenuti nel siero per periodi prolungati da plasmacellule a vita lunga che risiedono nel midollo osseo e costitutivamente producono anticorpi in assenza di antigene (Amanna et al., 2007; Manz et al., 1997; Slifka et al., 1998).

Si ritiene che l'ambiente del midollo osseo sia particolarmente favorevole per fornire i segnali di sopravvivenza necessari alle plasmacellule (Manz et al., 1997; O'Connor et al., 2004). È importante determinare in che modo la competizione per queste nicchie di sopravvivenza nel midollo osseo influisce sull'immunità indotta dal vaccino.

Un problema cruciale è il numero di plasmacellule che può ospitare il midollo osseo. Alcuni tipi di plasmacellule competono meglio per queste nicchie di sopravvivenza? Se sì, quali sono le caratteristiche che definiscono queste cellule?

Come possono essere generate (dal vaccino - ndr) tali plasmacellule? Le risposte a queste domande forniranno un approccio razionale allo sviluppo di vaccini che inducono le risposte anticorpali a lungo termine.

### **Importanza della immunità delle mucose nei confronti di quella sistemica**

Il sistema immunitario ha sviluppato due linee di difesa contro i patogeni (Tabella 1). La prima linea di difesa consiste negli anticorpi preformati nella mucosa (IgA e IgG) e cellule T di memoria effettrici presenti nei punti di ingresso di un patogeno. Anche gli anticorpi nel sangue forniscono un'importante prima linea di difesa contro gli agenti patogeni che si propagano attraverso il sangue (es. malaria, HCV etc.).

La seconda linea di difesa è costituita dalle cellule T e B di memoria presenti nei tessuti linfoidi;

queste cellule proliferano e si differenziano in cellule effettrici e migrano verso i siti di infezione. Va notato che le cellule di memoria elaborano funzioni effettrici rapidamente già nei tessuti linfoidi (molto più velocemente delle cellule naive) ma la loro importanza nella protezione immediata è limitata in relazione al tempo necessario per raggiungere i i siti di infezione.

Di conseguenza, la differenza più critica tra TCM e TEM non è tanto la velocità con cui diventano effettrici, ma la loro effettiva posizione anatomica. L'incapacità delle TCM di fornire una protezione immediata nei siti della mucosa è compensata dalla sua capacità di proliferare e generare un grande pool di cellule effettrici che sono fondamentali per limitare la diffusione dell'infezione e per l'eventuale eliminazione del patogeno.

Pertanto, un vaccino ideale dovrebbe indurre l'immunità sia della mucosa che di quella sistemica per fornire sia la prima che la seconda linea di difesa contro l'infezione e la malattia. Tuttavia, per i patogeni "colpisci e fuggi" che infettano i siti della mucosa e causano sintomi clinici entro 24-48 ore (es. Rotavirus, norovirus, batteri enterici, ecc.) è essenziale avere un'immunità della mucosa efficace. Questa prima linea di difesa è importante anche per virus come l'HIV che può stabilire un'infezione latente se l'acquisizione iniziale non è bloccata.

Sono stati fatti notevoli progressi nell'identificazione delle molecole di **homing** sulle cellule T e B necessarie per l'ingresso nei tessuti (Lefrancois and Puddington, 2006) (Tabella 2).

**Tabella 2**  
Molecole di homing dei linfociti utilizzate per l'ingresso nei tessuti

Tessuto	Recettore di homing espresso dai linfociti
Aree T and B nel linfonodo ( <a href="#">Bromley et al., 2008</a> ; <a href="#">von Andrian and Mackay, 2000</a> )	L-selectin, CCR7, CXCR4, CXCR5
Placche del Peyer ( <a href="#">von Andrian and Mackay, 2000</a> )	L-selectin, a4b7, CCR7, CXCR5, CCR6
Tessuti intestinali non-linfoidi ( <a href="#">Schon et al., 1999</a> ; <a href="#">Sigmundsdottir and Butcher, 2008</a> )	a4b7, aielb7(?), CCR9
Organi femminili delle riproduzione ( <a href="#">Nakanishi et al., 2009</a> )	a4b1, CXCR3
Pelle ( <a href="#">Sigmundsdottir and Butcher, 2008</a> )	CLA, CCR4, CCR10
Midollo osseo ( <a href="#">Denucci et al., 2009</a> ; <a href="#">Kunkel and Butcher, 2003</a> )	a4b1, CXCR4 a4b1, CXCR4
Vie aeree polmonari ( <a href="#">Kohlmeier and Woodland, 2009</a> )	a1b1, CXCR3, CCR4, CCR5

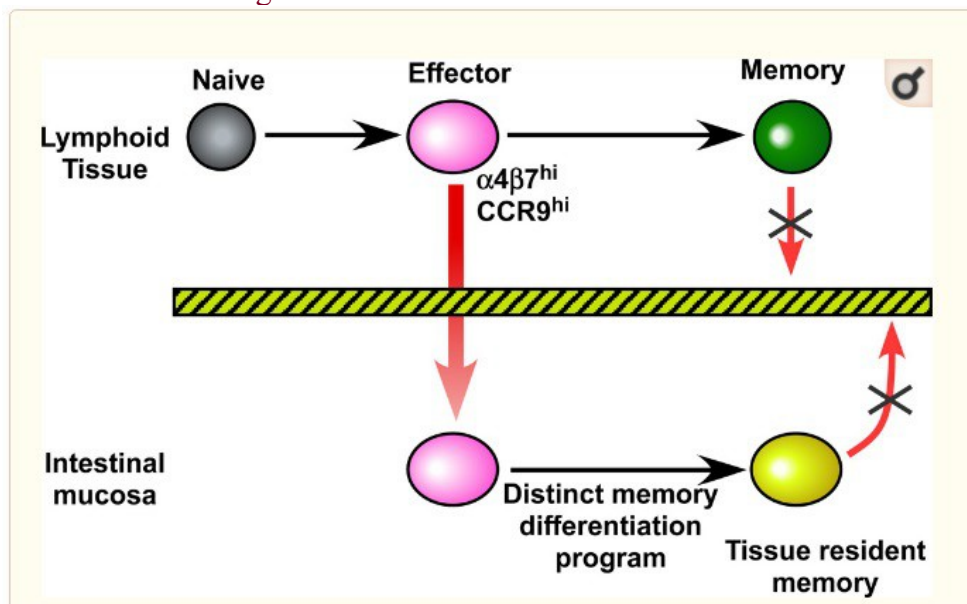
Di particolare interesse per l'immunità mucosale sono i recettori di homing che i linfociti utilizzano per la migrazione verso l'intestino, il tratto genitale e le vie respiratorie, i tre siti principali di ingresso dei patogeni. Non è ben conosciuto il meccanismo con cui questi recettori si sviluppano sulle cellule T e B attivate e come questa informazione può essere sfruttata per sviluppare vaccini che inducano un'immunità mucosale efficace.

Diversi studi hanno dimostrato che l'espressione di specifici recettori homing è accoppiata al luogo di attivazione; ad esempio, l'attivazione delle cellule T nei linfonodi mesenterici induce l'espressione di  $\alpha 4\beta 7$  che è necessaria per la migrazione nell'intestino mentre l'attivazione nei linfonodi inguinali induce l'espressione di molecole homing della pelle ([Sigmundsdottir and Butcher, 2008](#)). Questi dati sono coerenti con l'osservazione che le infezioni o i vaccini mucosali sono più efficaci per indurre una risposta delle cellule T e B in quell'area ([Plotkin et al., 2008](#)).

Tuttavia, ci sono molti esempi di infezioni sistemiche che inducono una buona immunità nella mucosa e anche di alcuni vaccini somministrati per via parenterale che provocano reazioni nella mucosa ([Plotkin et al., 2008](#)). Uno studio recente ha fornito una potenziale spiegazione per queste osservazioni mostrando che l'attivazione di cellule T CD8+ nella milza determina un programma di homing promiscuo in grado di guidare le cellule alla mucosa intestinale ([Masopust et al., 2010](#)).

La milza è un organo linfoide centrale e non è direttamente associata a nessuna particolare area corporea. Pertanto le cellule T attivate nella milza hanno un programma di homing promiscuo in modo che in caso di infezione possano indirizzarsi in diversi tessuti. In particolare l'espressione dei recettori homing per l'intestino sembra generalmente transitoria e solo le cellule T effettrici precoci della milza possono migrare verso l'intestino, per colonizzare la mucosa, in una finestra temporale molto corta (Fig. 1).

**Figura 1**  
Migrazione delle cellule T verso l'intestino



Cellule T CD8+ effettrici attivate nei tessuti linfoidi esprimono in modo transitorio recettori di homing per l'intestino ( $\alpha 4\beta 7$ , CCR9) e migrano nella mucosa intestinale. Queste cellule sono avviate ad un differente programma di memorizzazione nell'ambiente intestinale e non ricircolano più in altri tessuti. Queste cellule di memoria residenti costituiscono la prima linea di difesa contro i patogeni ivi localizzati.

Cosa succede alle cellule T dopo la loro migrazione nell'intestino? Diversi studi hanno dimostrato che queste cellule T non ricircolano come cellule della memoria nel sangue o in altri tessuti e subiscono un esclusivo programma di differenziazione guidato dal microambiente intestinale (Fig. 1) (Jameson e Masopust, 2009).

Una importante differenza tra immunità sistemica e mucosale è la durata della memoria.

Come descritto nelle precedenti sezioni di questa recensione, è ben documentato che la memoria sistemica persiste per lunghi periodi sia negli animali da esperimento che nell'uomo; questo è vero non solo per le cellule T e B di memoria, ma anche per i livelli di anticorpi nel siero che sono mantenuti da plasmacellule a lunga vita localizzate nel midollo osseo.

Al contrario, l'immunità mucosale è di breve durata. I meccanismi operanti in questa diminuzione della memoria nei siti della mucosa non sono ben compresi e questa rimane una delle problematiche più impegnative per la preparazione dei vaccini.

Molti sono i problemi critici:

- le cellule T di memoria effettrici nella mucosa si riciclano e per mantenere la concentrazione costante?
- In tal caso, questo è mediato dalle citochine o dalla periodica ri-esposizione all'antigene?
- Qual è la durata della vita inter-mitotica di queste cellule T di memoria residenti e quali sono le molecole necessarie per la loro sopravvivenza?
- Qual è la durata della vita delle cellule B di memoria e delle plasmacellule nei siti della mucosa?
- Le plasmacellule mucosali incontrano i segnali di sopravvivenza necessari e l'equivalente

delle nicchie presenti nel midollo osseo?

Uno studio recente osserva che vi è interferenza nei confronti delle risposte immunitarie precedentemente indotte nell'intestino, causata dalla concorrenza della continua stimolazione indotta dalla flora commensale (Hapfelmeier et al., 2010).

Occorre una risposta per capire come la memoria è regolata nella mucosa e per progettare strategie efficaci di vaccinazione per una immunità a lungo termine (Jameson e Masopust, 2009).

### **Ottimizzazione dei regimi vaccinali “prime-boost”**

(somministrazione di una dose del vaccino “prime” per attivare la risposta del sistema immunitario e, successivamente, una dose del secondo vaccino come booster per potenziare la risposta immunitaria allo scopo di valutare la durata dell'immunizzazione. Quello prime-boost è un approccio vaccinale consolidato nella prevenzione di diverse malattie infettive - v. Ebola)

Sono stati sviluppati molti vettori (batterici, virali, DNA) negli ultimi due decenni e uno sforzo considerevole è stato compiuto per ottimizzare il loro uso come vettori di vaccini.

Diversi studi hanno dimostrato che il potenziamento di un vaccino con vettori diversi che trasportano lo stesso antigene migliora la risposta immunitaria rispetto al potenziamento ottenuto con vettore omologo.

Tali approcci eterologhi prime-boost sono ora ampiamente utilizzati per sviluppare vaccini contro l'HIV, l'HCV, la malaria e la tubercolosi. Sebbene siano stati ottenuti risultati promettenti con vari vaccini eterologhi prime-boost, permangono alcuni punti oscuri.

Vengono trattati brevemente due argomenti chiave; in primo luogo, qual'è il momento ottimale per il potenziamento e in secondo luogo, qual è l'effetto di ripetuti richiami sulla qualità della risposta immunitaria.

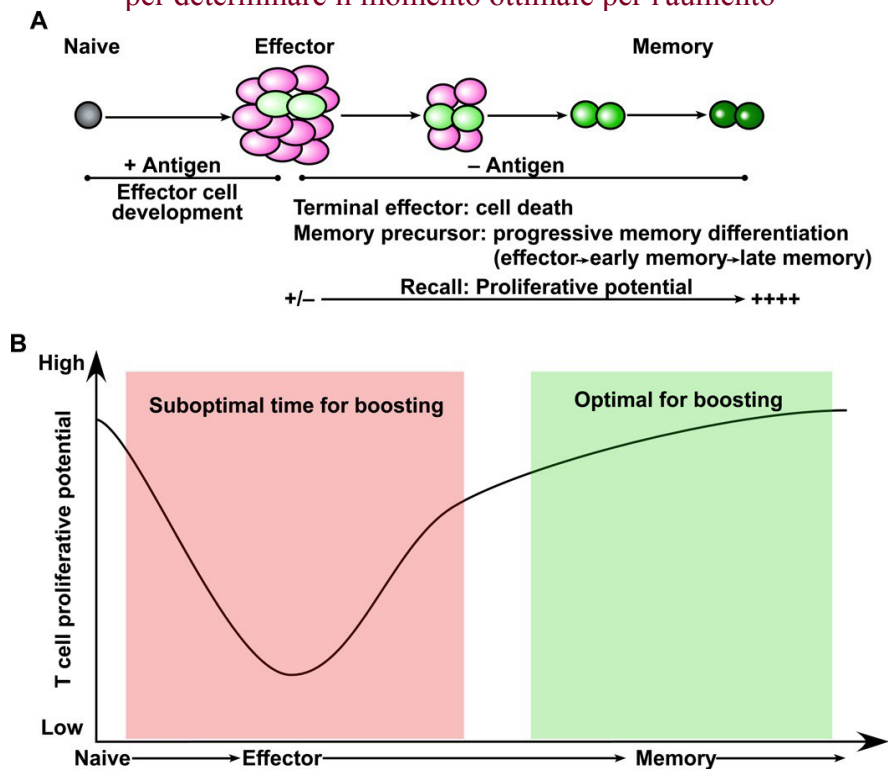
Nel determinare l'intervallo tra la prima immunizzazione e la seconda booster è importante considerare i percorsi di differenziazione delle cellule di memoria B e T. Le cellule T di memoria ad alto potenziale proliferativo non si formano fino a diverse settimane dopo la prima immunizzazione, quindi come regola generale è meglio avere un intervallo di almeno 2-3 mesi tra primo e secondo inoculo (Fig. 2).

Un potenziamento precoce darà, generalmente, risposte non ottimali. Regole simili si applicano anche per le risposte anticorpali poiché le cellule B di memoria devono passare attraverso le reazioni del centro germinale e impiegare diversi mesi per svilupparsi (Crotty et al., 2010).

Studi recenti hanno dimostrato che il boosting ripetuto può guidare le cellule T di memoria verso una differenziazione completa (Masopust et al., 2006; Wirth et al., 2010). Questo è utile per generare cellule T di memoria effettrici e anche l'homing alla mucosa ma si corre il rischio di esaurire la popolazione delle cellule di memoria centrale (Figura 3). Tuttavia, se i ripetuti richiami reclutano solo un sottoinsieme delle cellule di memoria precedentemente generate, allora questo si tradurrà in una popolazione eterogenea di cellule T di memoria in vari stadi di differenziazione (Figura 3). Questo potrebbe fornire il giusto equilibrio tra cellule TCM e TEM. In sintesi, con una giusta comprensione della differenziazione delle cellule di memoria T e B dovrebbe essere possibile ottimizzare le strategie di stimolazione prime-boost.

**Figura 2**

Applicazione dei principi della differenziazione delle cellule T di memoria per determinare il momento ottimale per l'aumento

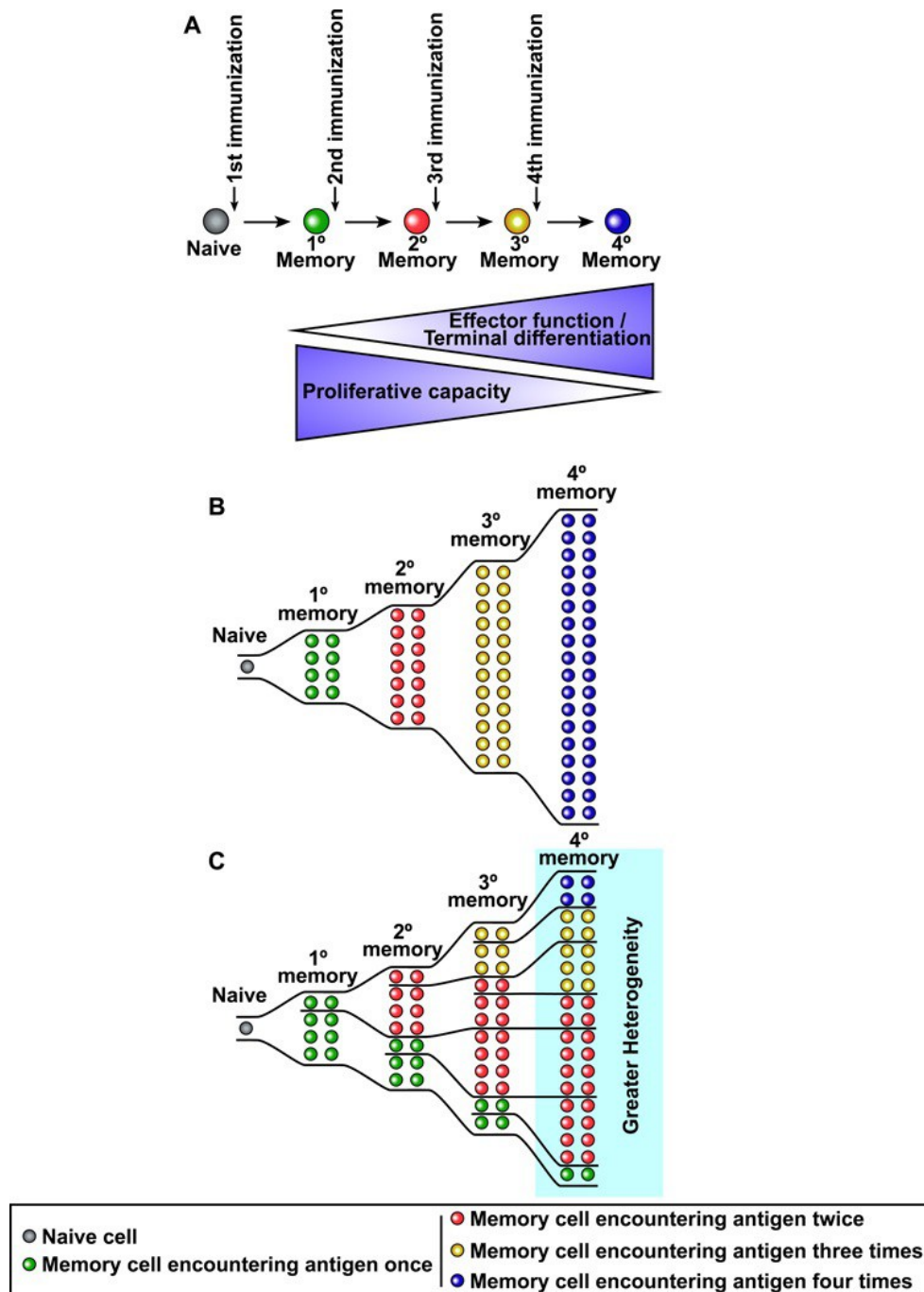


(A) Dopo la vaccinazione primaria le cellule T naïve proliferano e si differenziano in cellule effettrici. La maggior parte di queste subisce l'apoptosi, ma un sottoinsieme si differenzia ulteriormente per formare il pool di cellule di memoria a vita lunga. Questo modello di differenziazione delle cellule T a memoria progressiva è caratterizzato da un'acquisizione graduale delle proprietà delle cellule T di memoria, come la capacità di rendere efficaci risposte proliferative al richiamo con l'antigene.

(B) Sulla base di questo programma di differenziazione della memoria il momento ottimale per il potenziamento (boost) è durante gli stadi finali della transizione dalla cellula effettrice a quella di memoria (generalmente un intervallo di 2-3 mesi tra il prime e il boost).

**Figura 3**

Immunizzazioni ripetute guidano le cellule T della memoria verso la differenziazione completa: implicazioni per l'eterogeneità delle cellule di memoria e l'immunità protettiva



- L'incontro reiterato con l'antigene si traduce in cellule T di memoria soprattutto con proprietà effettrici e localizzazione preferenziale nei tessuti non linfoidi ma con un potenziale proliferativo ridotto.
- Se tutte le cellule T di memoria sono reclutate nella risposta successiva a ciascuna dose di richiamo, l'intero pool di cellule T di memoria verrebbe indirizzato verso la differenziazione terminale.
- Se solo alcune delle cellule T di memoria sono attivate da successivi richiami, allora si determinerebbe un pool eterogeneo di cellule T di memoria con cellule effettrici nei siti della mucosa e cellule di memoria con capacità proliferativa.

## **Regolazione della qualità delle cellule T di memoria**

Al fine di sviluppare vaccini efficaci contro patogeni come HIV, HCV, malaria, ecc., sarà essenziale che il vaccino induca non solo anticorpi neutralizzanti ma sia in grado di generare un'immunità efficace delle cellule T.

Sono stati fatti notevoli sforzi nello sviluppo di regimi vaccinali che inducano alte concentrazioni di cellule T di memoria, ma c'è stata scarsa attenzione sullo sviluppo di strategie per migliorare le qualità funzionali delle cellule T di memoria indotte dai vaccini.

Tuttavia, vi è ora un interesse sulle ricerche che mirano a modulare le qualità funzionali delle cellule di memoria, stimolando recettori innati appropriati sulla DC.

Recenti studi hanno indicato un approccio aggiuntivo utilizzando farmaci che agiscono direttamente sulle cellule T per regolare la differenziazione in cellule di memoria ([Araki et al., 2009](#); [Pearce et al., 2009](#); [Rao et al., 2010](#)).

Questi studi hanno dimostrato che l'obiettivo nei mammiferi della rapamicina è un importante regolatore della differenziazione delle cellule T CD8<sup>+</sup> di memoria e che la qualità delle cellule T di memoria può essere manipolata regolando la via mTOR.

La somministrazione in vivo di rapamicina, un inibitore specifico di mTOR, in topi vaccinati o infetti ha cambiato in modo significativo il destino delle cellule T CD8<sup>+</sup> antigene-specifiche. Il trattamento con rapamicina durante la fase di espansione delle cellule T ha aumentato la quantità di cellule CD8<sup>+</sup> di memoria, promuovendo la generazione di precursori di memoria che sopravvivono e si differenziano in cellule di memoria a vita lunga.

Questo trattamento ha prodotto un numero simile di cellule T CD8<sup>+</sup> effettrici antigene-specifiche al picco dell'espansione clonale, come nei topi non trattati, ma ha ridotto la apoptosi durante la successiva fase di contrazione.

D'altra parte, l'inibizione di mTOR con la rapamicina durante la fase di contrazione ha accelerato la transizione da effettrici a cellule di memoria e ha migliorato la qualità delle cellule T CD8<sup>+</sup> di memoria.

Pertanto, l'azione sul percorso mTOR può migliorare non solo la quantità ma anche la qualità delle cellule CD8<sup>+</sup> di memoria (Figura 4).

L'uso di farmaci che modulano la differenziazione della memoria è un nuovo approccio interessante per migliorare l'immunità prodotta dal vaccino.

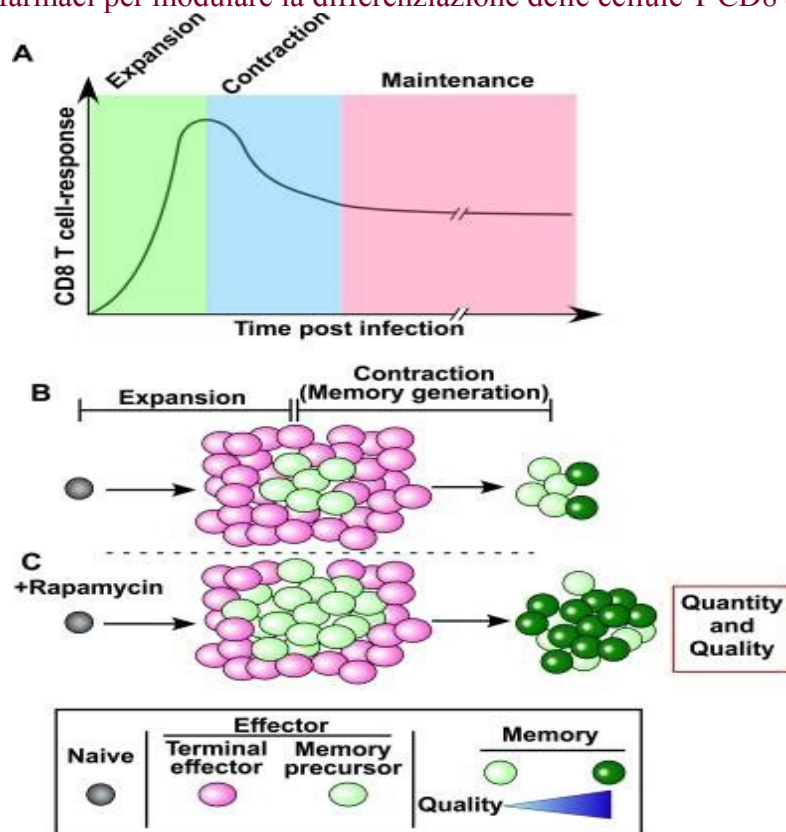
Poiché la rapamicina è stata storicamente utilizzata come "immunosoppressore", vi saranno evidenti preoccupazioni per la sicurezza sull'uso di questo farmaco come adiuvante del vaccino.

Tuttavia, dovrebbe essere possibile identificare farmaci più sicuri che mirano alla via mTOR come potenziali adiuvanti per migliorare le qualità funzionali delle cellule T di memoria.



**Figura 4**

Utilizzo di farmaci per modulare la differenziazione delle cellule T CD8+ di memoria



(A) Risposta delle cellule T CD8+ antigene dopo un'infezione acuta o la vaccinazione. Durante la fase di espansione, le cellule T CD8 naive proliferano e diventano cellule effettrici. Dopo la clearance del patogeno, dal 90 al 95% delle cellule T effettrici muoiono durante la fase di contrazione. Il 5-10% delle cellule T antigene-specifiche sopravvive e diventa la popolazione di memoria.

(B) senza trattamento con rapamicina.

(C) La rapamicina migliora la qualità e la quantità di cellule T CD8+ di memoria. Il trattamento con rapamicina aumenta le cellule effettrici precursori della memoria che sopravvivono durante la fase di contrazione, e migliora anche la qualità delle cellule T di memoria accelerando l'evoluzione da effettrici a cellule T di memoria.

### Dalla memoria immunitaria alla progettazione del vaccino

Come menzionato nella sezione precedente, i successi nei vaccini sono per lo più contro agenti patogeni invariati che causano infezioni acute seguite da immunità protettiva a lungo termine. Tuttavia, ci sono diversi casi in cui l'infezione primaria non porta all'immunità protettiva.

Questo è il caso dei patogeni altamente instabili come il virus dengue o il virus dell'influenza in cui la memoria stimolata dall'infezione naturale protegge dal virus omologo ma non da un diverso sierotipo (Green and Rothman, 2006; Halstead, 2007; Subbarao and Joseph, 2007), mentre nel caso dell'HIV-1 una rapida variazione del virus trasmesso rende inefficace la risposta immunitaria (Johnston and Fauci, 2007; McMichael et al., 2010; Moir and Fauci, 2009).

Per altri patogeni come RSV, la clearance dell'infezione non è seguita da memoria protettiva poiché la re-infezione con lo stesso virus può verificarsi più volte, sebbene con una riduzione della gravità della malattia. Infine altri patogeni come HCMV, EBV o M. tuberculosis non vengono eliminati dalla risposta immunitaria e stabiliscono uno stato di portatore a vita per l'instaurazione di un equilibrio tra la risposta immunitaria dell'ospite e il patogeno che persiste in uno stato latente (Reddehase, 2002; Sacchetti et al., 2008).

Lo stato di portatore a vita presenta un rischio di infezioni diffuse quando l'individuo va in immunosoppressione o immunodeficienza. Inoltre HCMV può superinfettare un soggetto già

immunizzato e lo fa eludendo la risposta delle cellule T CD8+, uno stratagemma che complica lo sviluppo di vaccini preventivi (Hansen et al., 2010).

L'analisi delle cellule umane di memoria può fornire nuove informazioni sullo sviluppo di vaccini contro i patogeni che inducono immunità parzialmente protettiva, non protettiva o non eradicano il patogeno?

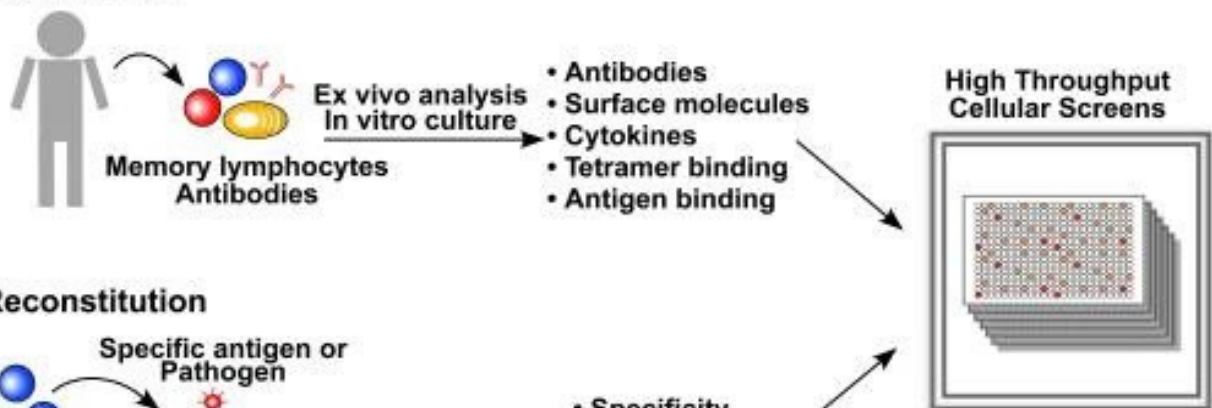
Studi recenti suggeriscono che è possibile sfruttare l'analisi della specificità e della classe delle cellule umane B e T di memoria per identificare gli epitopi conservati e i meccanismi effettori protettivi, il che costituisce una base razionale per la progettazione del vaccino.

Di seguito vengono discussi alcuni approcci metodologici e tecnici che facilitano questo processo definito "vaccinologia analitica" (Fig. 5).

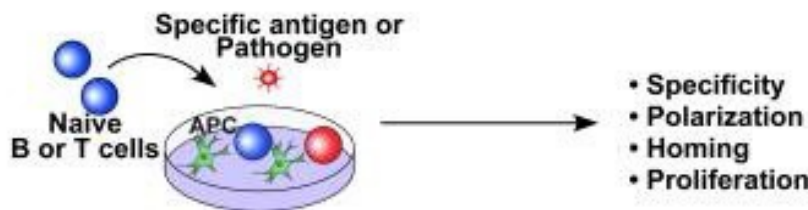
**Figura 5**

Uso della selezione cellulare ad alto rendimento per la progettazione di vaccini

**A. Interrogation**



**B. Reconstitution**



(A) Le cellule B e T di memoria possono essere isolate secondo l'espressione di marcatori di superficie e coltivate in condizioni di diluizione selettive per valutare specificità, fenotipo e funzioni delle singole cellule. Anticorpi specifici possono essere recuperati mediante immortalizzazione di cellule di memoria B o mediante amplificazione dei geni della regione V da singole cellule. Le librerie delle cellule T possono essere analizzate in modo iterativo per determinare a fondo la specificità e isolare i cloni di cellule T.

(B) Le cellule T naïve, stimolate in vitro con monociti o DC e patogeni interi, assumono il fenotipo di cellule T di memoria isolate ex vivo.

**Analisi di cellule B di memoria ed isolamento di anticorpi monoclonali**

Il concetto che potrebbero essere identificati antigeni protettivi a reazione crociata studiando la risposta anticorpale è stato inizialmente proposto nel contesto della progettazione del vaccino contro l'HIV (Burton, 2002). L'idea è di identificare attraverso l'isolamento di anticorpi ampiamente neutralizzanti (ossia contro più ceppi HIV - ndr) epitopi conservati e quindi di produrre immunogeni che contengono tali epitopi in modo immunodominante.

Questo approccio offre il vantaggio di concentrare la risposta immunitaria sugli epitopi più conservati evitando al tempo stesso una risposta ad antigeni più variabili.

Per molti anni l'isolamento degli anticorpi monoclonali ha rappresentato la parte più difficoltosa nell'analisi della risposta anticorpale umana e nell'identificazione degli antigeni bersaglio e degli epitopi conservati. Negli ultimi 5 anni sono diventati disponibili diversi metodi per isolare con alta efficienza gli anticorpi monoclonali umani dalle cellule B di memoria e dalle plasmacellule.

Questi approcci si basano sull'immortalizzazione delle cellule B di memoria totali seguite dalla selezione con test funzionali (Traggiai et al., 2004) o dall'isolamento di cellule B di memoria leganti l'antigene o di plasmacellule totali seguite dall'identificazione degli anticorpi specifici tramite PCR

di singole cellule ed espressione in sistemi eterologhi (Scheid et al., 2009; Wrammert et al., 2008). Utilizzando questi metodi è diventato possibile esaminare l'intero repertorio di anticorpi prodotti durante una risposta immunitaria o mantenuti nel compartimento della memoria. Questi approcci hanno già fornito risultati entusiasmanti con l'identificazione di anticorpi efficaci tipo quelli ampiamente neutralizzanti (ossia contro più ceppi – ndr) contro vari agenti patogeni umani.

Un tema comune che emerge da questi nuovi studi è che esistono anticorpi ampiamente neutralizzanti, ma possono essere estremamente rari. Un'analisi approfondita di migliaia di sieri da individui infetti da HIV-1 ha portato all'identificazione di solo due donatori dai quali sono stati isolati nuovi anticorpi monoclonali potenti e ampiamente neutralizzanti.

Questi anticorpi identificano epitopi altamente conservati nel sito di legame CD4 (Wu et al., 2010) così come epitopi conformazionali presenti nel trimero gp160 (gp dell'envelope di HIV - ndr) (Walker et al., 2009). Un altro esempio rilevante è la selezione, in alcuni individui, di cellule B di memoria che producono anticorpi ampiamente neutralizzanti contro i virus influenzali (Corti et al., 2010; Ekiert et al., 2009).

Questi anticorpi sono diretti contro gli epitopi conservati nella parte proteica dell'emagglutinina del virus influenzale e, sebbene meno potenti degli anticorpi neutralizzanti classici diretti contro la testa globulare, possono neutralizzare, in vitro e in vivo, i virus appartenenti a diversi sottotipi. Sulla base di questa acquisizione, è stato prodotto un vaccino senza emoagglutinina ed è stato dimostrato che conferisce un'ampia protezione nel modello animale (Steel et al., 2010).

Anticorpi monoclonali umani ad altissima attività neutralizzante contro l'HCMV sono stati isolati da donatori selezionati e utilizzati per mappare gli epitopi conformazionali su un complesso pentamerico che rappresenta una subunità candidata al vaccino (Macagno et al., 2009).

La risposta anticorpale umana al virus della dengue è stata minuziosamente analizzata attraverso l'analisi di anticorpi monoclonali che rivelano i meccanismi di base della neutralizzazione e il miglioramento dell'infezione (Beltramello et al., 2010; Dejnirattisai et al., 2010).

Infine, l'analisi di un gran numero di anticorpi monoclonali umani contro l'HIV ha rivelato un ruolo di reattività "allargata" nel tentativo di aumentare l'affinità degli anticorpi anti-HIV attraverso legami eterologhi, mediante un nuovo meccanismo per la produzione di anticorpi contro agenti patogeni con bassa densità di epitopi (Mouquet et al., 2010).

Oltre alla progettazione del vaccino, gli anticorpi monoclonali umani possono trovare un'applicazione diretta per la vaccinazione passiva, un approccio profilattico e terapeutico che è stato sviluppato più di cento anni fa e che è diminuito a causa della limitata produzione di sieri immuni (Casadevall et al., 2004).

Ad oggi solo un anticorpo monoclonale umanizzato è stato approvato per la prevenzione dell'infezione da RSV nei neonati, ma sono allo sviluppo diversi anticorpi umani per la prevenzione e il trattamento di vari patogeni e tossine. Una volta in produzione, anticorpi ampiamente neutralizzanti potrebbero essere utili in formulazione singola o cocktail per ridurre al minimo la selezione dei mutanti.

Occorre tenere presente che i saggi di neutralizzazione in vitro non riflettono pienamente l'utilità in vivo degli anticorpi poiché questa può dipendere in modo critico da meccanismi effettori come l'uccisione mediata dal complemento o la presenza sulle cellule (es. le DC) di recettori per Fc degli anticorpi (Hessell et al., 2007; Mozdzanowska et al., 2006). Si può quindi utilizzare l'infezione sperimentale di topi portatori di recettori Fc per anticorpi umani per studiare l'attività in vivo di anticorpi monoclonali umani (Nimmerjahn e Ravetch, 2008).

Un altro potenziale uso di anticorpi monoclonali umani è la somministrazione insieme a un vaccino per migliorare o modulare la risposta immunitaria. Gli anticorpi possono aumentare l'assorbimento dell'antigene indirizzando gli immunocomplessi ai recettori Fc espressi dalle DC, portando a una presentazione dell'antigene potenziata sulle molecole MHC di classe I e II e alla modulazione degli epitopi presentati (Simitsek et al., 1995). Inoltre, gli anticorpi possono attenuare o migliorare le risposte delle cellule B ai loro antigeni di centinaia di volte a seconda dell'isotipo e della stechiometria (Heyman, 2000). Quindi, combinando antigeni e anticorpi possiamo ottenere una convergenza di vaccinazione attiva e passiva.

## **Analisi delle cellule T di memoria e ricostruzione della risposta immune**

La selezione dei sottogruppi di cellule T di memoria ha rivelato aspetti fondamentali della risposta immunitaria rilevanti per la progettazione del vaccino.

Come su accennato i patogeni intracellulari, i patogeni extracellulari e i parassiti stimolano la produzione di cellule T effettrici e di memoria con differenti proprietà funzionali.

Pertanto è importante che i vaccini siano progettati per sfruttare l'intera gamma di funzioni effettrici che sono caratteristiche delle risposte protettive (Sallusto e Lanzavecchia, 2009). Mentre i vaccini costituiti da patogeni attenuati possono portare gli stessi PAMPS o suscitare le stesse DAMPS dei patogeni virulenti e quindi possono essere in grado di indurre lo stesso tipo di risposta, singoli antigeni isolati dal loro contesto e usati come proteine ricombinanti o inseriti in vettori eterologhi possono richiedere in modo critico adiuvanti in grado di indurre il tipo appropriato di risposta immunitaria.

Due approcci sperimentali possono dare una risoluzione a questi problemi:

1. analisi approfondita delle cellule T di memoria
2. la ricostruzione della risposta immunitaria in vitro (Fig. 5).

Sono disponibili diverse metodologie per caratterizzare la specificità antigenica per cellula, il profilo delle citochine, i recettori homing e le proprietà funzionali delle cellule T umane di memoria inclusa la citometria a flusso policromatica con tetrameri di peptide-HLA di classe I, anticorpi anti-molecole di superficie, citochine e fosfo-epitopi (Newell et al., 2009; Perez and Nolan, 2006).

Questa analisi può essere combinata con un profilo genetico globale che chiarisce aspetti specifici di risposta immunitaria (Berry et al., 2010; Querec et al., 2009).

Un approccio alternativo, adatto all'analisi delle risposte delle cellule T, HLA classe II ristrette agli antigeni complessi (anche patogeni interi) e non limitato a una particolare molecola HLA, consiste nello screening di librerie di cellule T reclutate da sottogruppi di cellule T effettrici e di memoria (Fig. 5) (Geiger et al., 2009).

Questo approccio sta rivelando una notevole compartimentalizzazione delle cellule T di memoria specifiche per patogeni in singoli sottoinsiemi di memoria (FS, non pubblicato).

Oltre all'analisi del pool di memoria, i tetrameri e le librerie delle cellule T possono essere utilizzati anche per analizzare i repertori CD8 e CD4 naïve (Geiger et al., 2009; Newell et al., 2009).

Prese insieme, le analisi ad alta precisione dei repertori di cellule T umane naïve e di memoria offrono da un lato la possibilità di presumere l'antigenicità e identificare gli epitopi per cellule T in patogeni complessi e dall'altro permettono di ottenere informazioni sulla classe di cellule T selezionate da un dato patogeno quindi fornendo due informazioni critiche che dovrebbero guidare la progettazione di un vaccino a cellule T.

Un obiettivo ambizioso è attualmente quello di ricostruire in vitro la risposta delle cellule T e B verso un patogeno (Figura 5).

Sebbene ciò possa eventualmente richiedere lo sviluppo di colture 3D organotipiche (Ma et al., 2010), l'innesco di cellule T CD4 naïve può essere efficacemente ottenuto mediante un mix in cultura con APC e patogeni (FS e Christina Zielinsky, non pubblicati).

Questi esperimenti di attivazione in vitro possono essere utilizzati per identificare i segnali polarizzanti nei patogeni complessi e per selezionare i segnali e i meccanismi di polarizzazione delle cellule T, che può aiutare a definire il giusto tipo di adiuvante da utilizzare nei vaccini a cellule T.

## **Osservazioni conclusive**

I molti recenti progressi nella comprensione del sistema immunitario e lo sviluppo parallelo di vari vettori e coadiuvanti hanno ora posto le basi in cui i principi della memoria immunologica possono essere utilizzati per progettare razionalmente la prossima generazione di vaccini contro le malattie infettive di importanza mondiale.

Inoltre, la migliore conoscenza della disfunzioni delle cellule T durante le infezioni virali croniche e i tumori saranno fondamentali per sviluppare vaccini terapeutici contro queste patologie.

Cresce la necessità di nuove iniziative per potenziare le ricerche nel sistema immunitario umano e per sintonizzare gli studi dell'immunologia di base con la ricerca sui vaccini.

Tra questi, l'istituzione della Society for Dendritic Cell and Vaccine Science ([www.dc-vaccine.org](http://www.dc-vaccine.org)) che è stata fondata con l'obiettivo di promuovere approcci interdisciplinari che sfruttano le proprietà del sistema immunitario innato per progettare nuovi vaccini.

### **Riferimenti bibliografici**

Date le caratteristiche dello studio che si presenta come sintesi e revisione delle ricerche che si sono occupate di queste problematiche, la mole dei lavori di riferimento è notevole. Chiunque può accedere ad essi tramite consultazione del lavoro originale:

**[From Vaccines to Memory and Back](#)**

**[Immunity - Volume 33, Issue 4 October 29, 2010](#)**

[https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(10\)00368-7](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(10)00368-7)