

Premessa

Alessandro Martella

A fine anni '80 - inizio anni '90 del secolo scorso, 2 immunologi, Melvin Cohn e Rodney E. Langman, si sono posti il problema dell'enorme differenza quali-quantitativa del pool di DNA patogeno mutante rispetto al DNA dedicato alle difese immunitarie in qualsiasi organismo, tanto più quanto più ridotte siano le sue dimensioni, ad esempio, in un topo.

A mio personale parere l'idea guida è molto semplice:

- 1) *se la complessità di un organismo vivente è determinata da un'insieme di unità semplici, **le cellule**, a loro volta specializzate in complesse e diverse funzioni, in forza delle strategie evolutive messe in atto da quello specifico sistema vivente nel corso di milioni di anni,*
- 2) *a pari modo, la complessità del sistema immunitario non prescinde dalla presenza di un fattore unitario, una "**unità immunologica**" dotata di una sia pur bassa autosufficienza (a sua volta compensata con diversi meccanismi) che viene reiterata in numero proporzionale alla massa dell'organismo di cui fa parte.*

Ne scaturisce una teoria che ha il suo riferimento principale nelle osservazioni del SI (Sistema Immunitario) dei vertebrati e che in una generalizzazione ad altri sistemi viventi potrebbe manifestare qualche discrepanza.

E' incontestabile che l'efficacia della funzione anticorpale dipenda dalla concentrazione di queste molecole, così come è incontestabile che il repertorio degli anticorpi funzionali debba essere relativamente piccolo, il che significa agevolmente e rapidamente selezionabile affinché sia prodotta una concentrazione sufficiente di anticorpi specifici in tempo utile per eliminare un pericoloso agente patogeno.

Pertanto, la cifra comunemente citata dai testi di immunologia della stima dell'ampiezza del repertorio di specificità anticorpali nell'intervallo che va da $> 10^{10-12}$ a "indefinito/infinito(?)" deve essere seriamente in errore.

Questa in sintesi è la **Teoria del Protecton**, la più piccola unità immunitaria autosufficiente ed efficace alla difesa contro il Non-Self.

Una semplice deduzione collegata a questo ragionamento è che la protezione fornita dal sistema umorale si deve obbligatoriamente basare sulla capacità degli anticorpi a reagire verso più antigeni (reattività aspecifica o crociata).

Attenzione la reattività crociata che verificiamo nei test di laboratorio non è la medesima di cui argomentano gli AA; quella di laboratorio è diretta contro singoli epitopi presenti in un test mentre quella teorizzata dagli AA è una reattività che coinvolge più epitopi (**almeno 3 e possibilmente fino a 10**) per organizzare una risposta efficace ad eliminare il non-self (patogeno interno o

esterno che sia).

La prova più evidente di questa deduzione è che la risposta anticorpale ad un antigene complesso non è monotona ma è costituita da famiglie di anticorpi differenti per avidità ed affinità, di cui una parte è in grado di reagire aspecificamente verso altri antigeni, spesso in modo casuale e non perchè correlati ossia appartenenti ad agenti patogeni consimili.

L'intrigante corollario della teoria del Protecton (NDR)

La teoria del Protecton pone limitazioni alla vastità del repertorio anticorpale, per motivi che potremmo definire di fisiologia naturale, ossia per teorizzare un S.I. capace di essere protettivo in sistemi viventi estremamente diversi per massa ed ambiente di vita e che, come asseriscono gli AA, consta in un repertorio di specificità anticorpali ben al di sotto della quota ricavata con il calcolo combinatorio (centomila volte inferiore) ed organizzato **per concentrazione** e non per quantità assoluta. Per pura curiosità, ammessa la concentrazione di 10^7 specificità/ml, osserviamo una quota di 10^{12} specificità in un organismo con un volume di 100000 ml cioè 100 lt. Tutti gli esseri viventi con un volume di una tonnellata contengono 10^{13} specificità in totale.

Pertanto, come suaccennato, la risposta anticorpale risulta costituita da un ventaglio di risposte che variano da parzialmente ad altamente specifica e che alle regioni estreme si possono incrociare con antigeni scarsamente correlati o anche autoantigeni (reazioni crociate, Ab eterofili, etc...).

Il concetto guida di questo corollario è che si elimina l'agente e si supera la malattia per il concorso contemporaneo di risposte a specificità ampiamente variabile.

Pertanto possiamo dedurre che la teoria del Protecton costituisca un'ottima piattaforma per 2 tipi di teoria della memoria:

- la teoria della memoria eterologa e policlonale
- la teoria dell'antigene residuo
(vedi I sezione degli appunti di Immunologia).

Un secondo corollario che può essere formulato, anche se meno evidente e alquanto azzardato, consiste nel presupporre che, nella realtà naturale (non sempre rappresentabile in vitro) gli anticorpi selezionati dal contatto con l'antigene raramente siano al massimo livello di affinità (sforzo che richiederebbe un repertorio financo superiore alle 10^{12} specificità teoriche: questo evento potrebbe agevolare un'aumento significativo della fisiologica quota di autoanticorpi) ma sia a livelli intermedi tali da soddisfare la soglia minima di concentrazione di anticorpi specifici di 10 ng/ml, efficace per l'eliminazione di un patogeno.

Tutto questo verrebbe realizzato, durante una infezione, tramite un gioco biologico di standby pilotato dalla diminuzione della concentrazione antigenica proporzionale

all'efficacia della risposta immunitaria.

Il coinvolgimento di anticorpi ad alta affinità, paradossalmente, potrebbe non essere necessario ai fini della guarigione grazie ad una rapida eliminazione dell'antigene ottenuto tramite famiglie anticorpali meno affini ma più veloci (perchè presenti nel repertorio in alta concentrazione).

Si tratta di un'ipotesi non facilmente verificabile e comunque non escluderebbe la stimolazione e clonazione di cellule B ad alta affinità.

A questo punto gli AA introducono nella loro teoria il

Concetto di equivalenza

Secondo il calcolo combinatorio applicato, il repertorio delle cellule B non può essere maggiore di $10^4 - 10^5$ diverse specificità/ml.

In conclusione un repertorio di cellule B superiore a 10^{12} , descritto in letteratura, è davvero sovrastimato di un fattore superiore a 10^6 ?

Un repertorio di anticorpi costituito da 5×10^4 specificità sembra troppo piccolo se consideriamo che gli alleli già noti di antigeni batterici e virali comuni da soli superano la quota 10^4 .

Dobbiamo ribadire 2 punti fondamentali:

1. Innanzitutto, non esiste un'identità perfetta tipo 1:1 tra le specificità anticorpali e gli antigeni.
2. In secondo luogo, il repertorio funzionale di 5×10^4 /ml è stato stimato sulla base della necessità di produrre anticorpi funzionali/ml entro il confine omeostatico di 10^7 cellule B /ml.

Si ribadisce l'ipotesi che una concentrazione soglia di 10 ng/ml di anticorpi specifici contro un antigene (necessaria per eliminarlo) potrebbe essere ottenuta con un anticorpo estremamente specifico "tipo monoclonale" in concentrazione 10 ng/ml oppure dieci diversi monoclonali (tutti specifici per lo stesso antigene) ciascuno in concentrazione 1 ng/ml.

Questa è l'**equivalenza** tra diversi campioni di 10^7 cellule B, raggiungibile, in via ipotetica, tramite due tipologie di cellule/anticorpi:

1. un tipo comune e presente in un numero di copie elevato di cellule B (100 copie per 10^7 cellule B è vicino alla realtà secondo i calcoli degli AA). Fa parte dello "stage I", il repertorio della linea germinale.
2. L'altro tipo di anticorpo è prodotto da cellule B in singola copia per 10^7 cellule B totali. Fa parte dello "stage II" il repertorio ottenuto per mutazione somatica dal precedente.

La concentrazione funzionale viene determinata dalla somma di anticorpi sintetizzata da queste 2 famiglie di B cellule.

In tal modo ci si ricollega alla teoria della memoria eterologa e

consimili.

In effetti il trattamento di ogni antigene in maniera specifica e peculiare per ciascuno di essi da parte del S.I. è reale, **ma questo non significa che la risposta immunitaria è univoca, irripetibile per ciascun antigene.**

L'aforisma "per ogni antigene, un anticorpo specifico" è errato.

Il trattamento originale ed indipendente di ogni antigene non prescinde dalla probabilità che due antigeni a caso condividano tre o più epitopi.

L'alto livello di reazioni crociate rivelato dai saggi di laboratorio è una testimonianza di ciò che succede nella realtà naturale, ma non costituisce una prova della cross-reattività naturale, perché questi saggi misurano singoli epitopi condivisi mentre, per la cross-reattività naturale all'interno di una tipica risposta immunitaria, sono necessari tre o più epitopi condivisi.

E' possibile anche giustificare l'idea che il S.I. sia costituito da un repertorio limitato per competere con una massa quasi illimitata di antigeni.

Basta riflettere su quante diverse combinazioni si possono ottenere con 5×10^4 epitopi (ossia 5×10^4 differenti siti di combinazione) combinati in pacchetti di 10 alla volta.

La risposta è stupefacente e consiste in $2,7 \times 10^{40}$ possibili combinazioni per contrastare altrettanti diversi siti antigenici.

La combinazione è la vera risposta specifica, "singola ed originale" verso un antigene. Questa sembra essere la conclusione di questo lavoro - ndr

Anche se vogliamo considerare una risposta immunitaria "bloccata" al limite inferiore del riconoscimento di 3 epitopi per antigene, le combinazioni ottenibili dal repertorio sarebbe:

$(5 \times 10^4)^3 =$ a oltre 10^{12} "combinazioni diverse" di 5×10^4 epitopi.

Questa strategia rappresenta una soluzione notevolmente efficiente per contrastare un numero quasi illimitato di possibili antigeni pur conoscendone in partenza una limitata quantità, grazie ad un sistema di combinazioni biologiche delle variabilità, quasi illimitato.

Considerazioni finali sul Protecton, L'unità umorale di protezione immunologica

Ciascun campione di 10^7 cellule prese da un qualsiasi vertebrato (su cui è calibrato questo lavoro, sia esso un girino, un essere umano o un elefante) ha sempre 5×10^4 diverse specificità e fra le diverse specie il pacchetto delle specificità immunitarie non è esattamente lo stesso, orientato per i tipi di antigene a contatto degli organismi e specializzato, in buona parte, in relazione alla nicchia ecologica occupata.

Inoltre, bisogna tenere in considerazione che gli animali di piccola taglia esistono in popolazioni più numerose con elevata prolificità rispetto agli animali più grandi e le conseguenze

dell'eliminazione del 50% della popolazione (ad es. un topo) ogni anno sono meno catastrofiche rispetto ad una pari eliminazione di un animale di grossa taglia e bassa prolificità.

In questo senso, ha un suo significato biologico la probabilità che un eventuale deficit di repertorio per individuo (*rapportato alla taglia e alla evoluzione del S.I. della specie - ndr*) possa essere controbilanciato dal numero, in modo che la massa vivente possieda in toto una variabilità di repertorio ed un numero totale di cellule B molto simile, per cui se potessimo calcolare le potenzialità di difesa, le troveremmo pressappoco simili fra le specie.

Un Protecton con meno di 10^7 diversità avrà meno di una copia di una cellula B specifica /ml e il teorema della equivalenza non potrebbe operare.

Attenzione, non potrebbe operare per individuo, ma se la specie ha una dimensione numerica tale da concedere alla natura la perdita del 90% della popolazione (ad es. i girini) allora l'unità di base, il Protecton, potrebbe essere ridotto ad 1/10 dello standard richiesto per individuo, lasciando alla selezione il compito della sopravvivenza di quel 10% di individui con le specificità adatte in quel momento ed in quell'ambiente.

A mio modesto parere le conclusioni di questo pregevole studio sembrano essere approssimative (mi allineo alle critiche espresse da alcuni ricercatori) soprattutto in confronto alle notevoli intuizioni che ne costituiscono la premessa e che la maggior parte degli scienziati avevano riconosciuto come geniali.

Anche ammettendo le limitazioni che derivano dalle conoscenze dell'epoca (l'articolo originale è del 1992 e le prime pubblicazioni sono del 1989) un costrutto teorico deve avere una impalcatura che preveda gli sviluppi futuri di una scienza. Resta salda, almeno per me, l'idea che vi sia una unità di base, una specie di mattoncino immunitario che permetta a qualsiasi essere vivente di rispondere alla offesa antigenica sia interna che esterna, salvo poi reclutare un apparato più complesso e sofisticato (immunità acquisita) che tra l'altro fa ricorso alle reazioni crociate, come fenomeno naturale e non semplice osservazione di laboratorio.

Comunque l'odierno stato dell'arte è rappresentato dal concetto di ridondanza, ossia dall'ipotesi che vi siano diversi percorsi immunitari (a seconda delle varie specie, comprese le piante) per ottenere lo stesso effetto di protezione.

Queste recenti elaborazioni scientifiche sono descritte in un articolo di revisione dello stato dell'arte di Pradeau - Du Pasquier del 2018, che sarà oggetto della prossima sezione degli appunti - ndr.

Definizioni finali

Il Protecton, unità di protezione immunitaria, contiene naturalmente un campione di 10^7 cellule B e la sua funzione è determinata da diverse condizioni limite (assunti):

1. avere almeno il 10% del repertorio sotto pressione antigenica (ovvero reclutamento costante del 10% delle cellule B per stimolo Ag)
2. attivazione dell'esclusione aplotipica in misura sufficiente a garantire, entro i limiti fisiologici, un basso livello di cellule con doppia specificità (spesso di tipo antiself + anti-nonselself) che potrebbero provocare autoimmunità letale
3. Occorrono 3 o più anticorpi che reagiscono con determinanti diversi dell'antigene per formare un aggregato tridimensionale utile ad inattivarlo/eliminarlo in modo efficiente.
4. generazione di una protezione anticorpale efficace di 100 ng/ml, mediamente in 4-5 giorni.

Gli AA medesimi reputano di avere appena scalfito la superficie di un affascinante processo evolutivo che ha messo a confronto la massa, in rapida evoluzione, dei batteri, virus, funghi ed altri esseri viventi che possano essere causa di malattia in contrapposizione all'evoluzione somatica del sistema immunitario umorale di altri esseri viventi (soprattutto i vertebrati).

I principi della funzione anticorpale, come illustrati ed ipotizzati, sembrano essere abbastanza credibili, sia dal punto di vista della dinamica dell'azione che delle osservazioni scientifiche di biologia molecolare.

Analisi e valutazione critica della teoria del Protecton

Come tutte le teorie anche quelle elaborate da Langman e Cohn prestano il fianco alla critica letteraria.

E come tutti gli esercizi della critica ci sono quelli utili che stigmatizzano i punti deboli del costrutto ideologico e quelli che sono meno accettabili fino a rappresentare solo carta straccia.

Fra le prime c'è quella pubblicata nel 1990 da Christopher COLECLOUGH del Department of Immunology. St. Jude Children's Research Hospital. Memphis. Tennessee 38101. U.S.A.

Nel suo articolo Coleclough plaude alla impostazione ideologica dell'elaborato teorico di Langman e Cohn ma dissente ampiamente dalle risoluzioni offerte dai due autori, giudicate come troppo scolastiche e dogmatiche fino al punto di non essere dimostrabili. Crederci o no diventa secondo Coleclough un atto di fede impossibile da dimostrare con la sperimentazione.

Su questo percorso critico si sono posizionati altri immunologi e non gli si può dar torto nell'aver definito poco elaborato e difficile da verificare il meccanismo d'azione del protecton, tagliato su misura sulla classe dei vertebrati e concepito in alcune fasi con delle approssimazioni eccessive.

Nessuno di essi si è comunque immaginato minimamente di contestare il concetto che **un'entità biologica complessa come il sistema immunitario deve iniziare con i principi evolutivi - un tema guida del pensiero di Langman.**

L'insistenza di Langman sull'uso di argomentazioni evolucionistiche ha evidenziato per la prima volta la relazione tra quello che in seguito sarebbe diventato popolare come sistema

immunitario "innato" e il cosiddetto sistema "adattativo / acquisito". Sono state stabilite le basi concettuali per la discriminazione self-non self e per la regolamentazione della classe effettrice. Le cellule T "regolatorie" o soppressorie, così in voga oggi, sono state previste e descritte come elementi necessari per la regolazione della classe effettrice.

Gli "altri punti di vista" non in linea con la teoria di Langman, *reti idiotipiche, circuiti soppressori e repertori trascendentali*, sono scomparsi nel tempo.

Inoltre Langman è stato un antesignano nell'uso del computer come strumento per analizzare le conseguenze dei modelli concepiti sui principi teorici (AIS : Artificial Immune System).

Diversa la posizione critica di altri ricercatori come Sol Efroni e Irun R. Cohen, che contestano Langman e Cohn nei fondamenti odierni dell'Immunologia cioè la teoria della Selezione Clonale, la discriminazione self - non self (S-NS) e se guardiamo più in fondo la stessa teoria dell'evoluzione, a favore di qualcos'altro che non spiegano a fondo, sostituendo la discriminazione S-NS con una oscura "teoria dell'infiammazione" e con l'"autoimmunità fisiologica".

In un precedente lavoro Irun R. Cohen fa riferimento ai suoi studi sulle cellule T autoimmuni dirette agli antigeni della mielina, che provocano l'encefalomielite autoimmune (EAE), e che normalmente sono abilitate a proteggere il SNC contro la degenerazione cellulare che segue una lesione traumatica.

[il fenomeno potrebbe essere agevolmente liquidato come un chiaro esempio di degenerazione autoimmune causato dalle reazioni crociate di Cohn e Langman a seguito di meccanismi patogeni contro il self innescati da non self - NDR].

I 2 esempi di critica scientifica delle teorie di Langman e Cohn sono inseriti al termine di questo articolo:

- **Una critica alla teoria del Protecton di Cohn-Langman** - Christopher COLECLOUGH - Immunological Reviews, Volume 115, Issue 1 -1990
- **L'euristica della teoria biologica: il caso della discriminazione self - nonself** - Sol Efroni e Irun R. Cohen - Cellular Immunology 223 (2003) 87-89

Rodney Eric Langman è morto il 13 agosto 2002 dopo una lunga e coraggiosa lotta contro il cancro ai polmoni.

Non ha avuto il tempo e forse nemmeno la testa per rispondere ad Efroni e Cohen, ma l'ha fatto Cohn: io non ho letto la sua risposta e forse (come mi piace pensare) non ne valeva la pena.

Della figura di Langman, rimane il necrologio commovente scritto dal suo amico Cohn:

...Rod aveva una mente ascetica. Non cercò alcun riconoscimento e non fece alcun tentativo per crearsi una carriera accademica. Tutto ciò che voleva era il tempo per esprimere il suo pensiero...

...Tuttavia, come comunità, tendiamo ad isolare i nostri

*studiosi, i nostri interpreti della conoscenza e coloro che concettualizzano le nostre scoperte sperimentali...
...Con la frammentazione della Immunologia e la specializzazione sempre crescente, coloro che pensano oltre i "confini sperimentali" diventeranno davvero inestimabili...
...Ecco perché, in un modo che non saremo mai in grado di valutare, la sua morte è una perdita per la comunità che inciderà silenziosamente ed inesorabilmente lungo la strada...*

Segue nell'ordine.

Melvin Cohn e Rodney E. Langman

Il sistema immune: un punto di vista complessivo - [Frontiers in Bioscience 1, d318-323, 1 Ottobre 1996]
sintesi generica divulgativa delle loro ricerche

Rodney Eric Langman (2/2/1944 - 13/8/2002)

Economia molecolare e funzione anticorpale: elaborazione della teoria del Protecton - International Journal of Clinical and Laboratory Research March 1992, Volume 22, Issue 1-4, pp 63-68
lavoro originale di Langman

cui seguono i sunnominati articoli critici nei confronti degli studi di Melvin Cohn e Rodney E. Langman

Il sistema immune: un punto di vista complessivo

[Frontiers in Bioscience 1, d318-323, 1 Ottobre 1996]

Melvin Cohn¹ e Rodney E. Langman

1) *The Salk Institute, P.O. Box 85800, San Diego, California, 92186-5800 USA*

RIASSUNTO

La discriminazione self-nonsel (S-NS) è codificata nella linea germinale per i meccanismi di difesa innati (sistema immunitario innato dei vertebrati), ma è poi rielaborata per riarrangiamento somatico nei sistemi immunitari superiori.

L'acquisizione di una discriminazione S-NS per ricombinazione somatica durante l'evoluzione dei vertebrati ha permesso al sistema immunitario di questi ultimi di sviluppare grandi repertori di riconoscimento dell'antigene rispetto a quello ottenibile dai meccanismi di difesa innati.

Il fatto che il repertorio immunitario abbia un'apparenza sconfinata ha aperto un notevole dibattito fra gli immunologi da quasi un secolo.

Oggi abbiamo una migliore comprensione delle dimensioni e della funzione del repertorio anticorpale. Le funzioni effettrici di un anticorpo umorale dipendono dalla sua classe e dalla necessità di raggiungere una soglia minima efficace di concentrazione, in un tempo sufficientemente breve, per fermare la crescita di un agente patogeno prima che diventi letale.

Ciò richiede un numero "equivalente" di cellule B **per ml di volume dell'organismo** in risposta al patogeno. Di conseguenza, il sistema immunitario umorale consisterebbe in una somma di queste unità di difesa / ml, reiterate in base al volume dell'organismo.

Questa semplice conclusione ha implicazioni di vasta portata, alcune delle quali sono esplorate in questa recensione.

INTRODUZIONE

Tutti gli organismi viventi hanno bisogno di meccanismi che forniscano protezione contro l'aggressione di agenti patogeni.

I procari e gli eucarioti invertebrati hanno adottato una varietà di tali meccanismi, inclusi enzimi di restrizione, lectine, peptidi litici, fagociti, ecc. (1).

Questi sono meccanismi di difesa naturali presenti negli organismi più semplici e nei vertebrati che sono dotati anche di un sistema immunitario. L'insieme di meccanismi di difesa e sistema immunitario cooperano nella discriminazione self-nonsel (S-NS) perchè collegano l'elemento di riconoscimento del non self all'insieme di funzioni effettrici di distruzione del patogeno.

L'attività immunitaria deve essere autoregolata in maniera da consentire la distruzione del patogeno senza provocare danni in misura significativa all'ospite, fino all'autodistruzione (un tale organismo verrebbe cancellato per mezzo della selezione evolutiva).

La discriminazione S-NS è codificata nella linea germinale ossia nel "sistema immunitario innato" organizzato per fornire i meccanismi di difesa, ma è anche soggetta, negli organismi superiori, al riarrangiamento somatico del sistema immunitario acquisito. Questo dualismo fa riferimento ai meccanismi di difesa dei vertebrati.

L'acquisizione di una discriminazione S-NS somatica appresa durante l'evoluzione dei vertebrati ha permesso al sistema immunitario di sviluppare il riconoscimento di grandi repertori antigenici rispetto a quelli ottenuti dai meccanismi di difesa innati. La dimensione apparentemente sconfinata del repertorio immunitario è oggetto di un complesso dibattito fra i ricercatori.

Il riconoscimento dell'antigene a sua volta è legato indissolubilmente allo sviluppo dei

sistemi biologici di contenimento dell'azione dannosa dei patogeni.
Senza di essa l'organismo è destinato alla selezione evolutiva negativa.

IL PERCORSO DI ATTIVAZIONE DI UNA RISPOSTA IMMUNE

Il primo livello prevede il riconoscimento self-nonsel.

Di fronte al self la risposta immunitaria deve essere disattivata.

Se è Non self, deve essere attivata una risposta immunitaria e il controllo passa al livello 2, al fine di selezionare la classe di effettori ottimale per eradicare il patogeno.

La selezione si rende necessaria per coordinare reazioni effettrici multiple, spesso contraddittorie e talvolta dannose e d'altra parte per ogni agente patogeno, ci sono funzioni effettrici efficaci ed inefficaci, che spesso competono per il riconoscimento dell'antigene con il rischio di annullare una difesa.

La discriminazione S-NS, determina la specificità con cui la risposta dei meccanismi effettori libera dal patogeno senza attivare un'autodistruzione. La specificità della risposta dell'effettore è composta da diversi elementi, uno dei quali è la specificità dei recettori cellulari per l'antigene.

Al secondo livello, la scelta del tipo di funzione effettrice è determinata dalla natura dell'agente patogeno e dalla sua collocazione, poiché questi fattori determinano la capacità di un particolare meccanismo effettore di eliminare il patogeno.

Ad esempio, agenti patogeni intracellulari come virus, batteri intracellulari, rickettsie e alcuni parassiti protozoari richiedono l'intervento dei meccanismi effettori responsabili della risposta cellulomediata.

In generale, la risposta cellulomediata è una tattica ritardata. L'infezione è rallentata ma non superata. Una cellula infetta da virus che viene lisa da un linfocita citotossico può liberare un virus in grado di infettare altre cellule anche se con una resa molto più bassa e per eliminare questo virus alla fine è necessaria la risposta umorale. In molti casi di infezione virale, la risposta dell'effettore è inizialmente cellulomediata con un successivo passaggio alla risposta umorale.

In alcuni casi, in genere con patogeni intracellulari non virali, la modalità cellulomediata è sufficiente per tenere sotto controllo l'infezione.

Agenti patogeni liberi, come i batteri, richiedono inizialmente una risposta anticorpale umorale. In questo caso ci sono una serie di meccanismi effettori disponibili per il sistema immunitario; tra cui la lisi mediata dal complemento, la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), l'opsonizzazione, l'intervento di agenti chimici (ad es. rilascio di istamina, serotonina, enzimi), neutralizzazione della tossicità e blocco dell'invasività del patogeno. Queste funzioni effettrici sono associate a diversi isotipi Ig, anche con qualche sovrapposizione. È necessaria la selezione tra gli isotipi per eliminare il patogeno.

Ci sono tre domande chiave da considerare.

Quali sono i fattori che regolano una discriminazione S-NS nell'immunità acquisita?

Che succede dal punto di vista evolutivo quando viene selezionata un tipo di risposta umorale?

Quali sono i requisiti per la selezione della classe anticorpale?

LA DISCRIMINAZIONE S-NS IN SINTESI

La discriminazione S-NS, un processo dell'immunità acquisita, dipende da:

1. Le cellule sensibili agli antigeni (i-cellule = cellule i-niziali) nascono in un "i-stato" iniziale senza una funzione effettrice e con due percorsi, inattivazione o attivazione, la cui direzione viene decisa in seguito all'incontro con l'antigene.
2. Il self viene definito come l'insieme di antigeni che sono presenti durante l'ontogenesi del sistema immunitario e persistono.

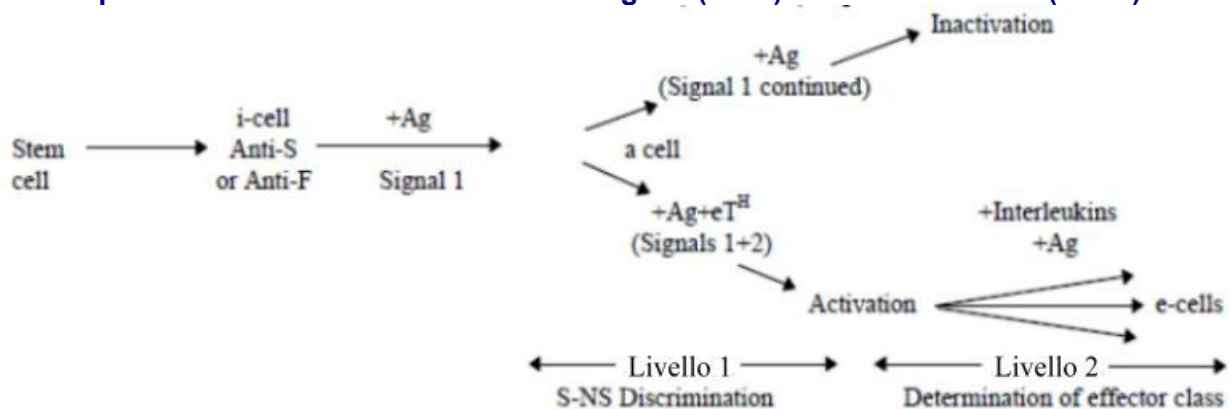
3. Il non self viene definito come l'insieme di antigeni che vengono in contatto del sistema immunitario dopo la sua maturazione in modo transitorio.

Un processo di apprendimento significa che la via intrapresa da una i-cellula al momento del contatto con l'antigene dipende dalla precedente esperienza del sistema immunitario rispetto a quell'antigene (memoria immunitaria).

Una scelta tra due percorsi richiede due segnali. L'uno di interazione della i-cell con il segnale di inattivazione dell'antigene (signal 1).

Se, oltre al segnale 1, la i-cellula riceve un secondo segnale (signal 2), allora la cellula subirà una attivazione e procederà verso ulteriori passaggi di divisione e differenziazione verso meccanismi effettori (livello 2) posti sotto il controllo delle interleuchine.

Figura 1
Il percorso da cellula stimolata dall'antigene (i-cell) a cellula effettrice (e-cell)



La presenza o assenza del segnale 2 determina se una cellula immunitaria è attivata o inattivata/eliminata. Pertanto, la questione centrale è: "Cosa regola la elaborazione del segnale 2."

Abbiamo sempre insistito sul fatto che il segnale 2 deve essere fornito da una cellula effettrice T-helper (e-TH), con lo stesso grado di specificità antigenica di tutti gli altri meccanismi effettori e che è stata sottoposta essa stessa ad una selezione S-NS. Il rilascio del segnale 2 deve essere a corto raggio (un'interazione cellula-cellula tra e-TH e una i-cell) e richiedere il riconoscimento associativo dell'antigene (cioè, devono essere riconosciuti due o più determinanti presenti sull'antigene, anche in modo indipendente e non coincidente, sia dalla cellula e-TH che dalla i-cell).

Il riconoscimento associativo dell'antigene è l'unico modo per assicurare una risposta coerente delle i-cellule a qualsiasi epitopo collegato all'antigene.

Ciò solleva la seguente domanda:

Se è necessaria una e-TH per attivare tutte le i-cellule inclusa una eventuale i-TH, da dove viene la prima e-TH?

Questa è la "questione di fondo."

Nel corso degli anni ci sono state due risposte alla questione di fondo.

- 1) Sono necessarie le e-TH per l'attivazione di tutte le i-cellule, eccetto le i-TH. Queste ultime evolvono in e-TH dopo aver ricevuto il segnale 1 in presenza di agenti "infiammatori" aspecifici, sistemi adiuvanti, quali alcuni agenti costimolatori, necrosi cellulare, ecc.

In questa ipotesi, l'evento di attivazione non specifico non ha nulla a che fare con la discriminazione S-NS. Quindi la discriminazione S-NS deve essere effettuata a priori eliminando tutti gli anti-Self dalla popolazione di cellule i-TH prima che possano essere accidentalmente attivate da un segnale non specifico. Questa regola di attivazione non specifica si applica solo alla generazione di tutte le e-TH.

- 2) Sono necessarie e-TH per l'attivazione di tutte le i-cellule, incluso altre i-TH e, pertanto, deve esserci una via indipendente di discriminazione S-NS rispetto al classico riconoscimento del non-self che riesca a stimolare la maturazione da i-TH ad e-TH.

In questa ipotesi, le regole del riconoscimento associativo dell'antigene sono universali e includono gli i-TH.

La via indipendente del riconoscimento dell'antigene da i-TH ad e-TH provvede ad un livello iniziale di attivazione di alcune e-TH anti non-self che poi agiscono su tutte le i-cellule.

Il modello 1) per l'origine di e-TH ha diverse varianti. Quella più interessante viene definita "modello di pericolo".

Come in tutti i modelli di attivazione basati su un segnale 2 induttivo che viene fornito da una sorgente che non ha subito la discriminazione S-NS (definita "aspecifica"), è necessario concepire una serie di passaggi di filtraggio ed eliminazione delle cellule anti-self prima che subiscano un'attivazione aspecifica.

Secondo il "modello di pericolo", questo si realizza in due fasi.

Gli i-TH nascono nel timo dove viene presentata la maggior parte del self e dove viene eliminata la maggior parte degli i-TH anti-self. Per gli auto-antigeni presenti unicamente in periferia (cioè non presentati nel timo) agisce un altro meccanismo che si basa sulla compartimentazione del self su APC (cellule presentanti antigene) che inducono in modo univoco tolleranza e del non-self su APC che promuovono l'attivazione immunitaria (attivazione da segnali biochimici "di pericolo", una proprietà univoca del not-self).

Anche se noi sosteniamo che il "modello di pericolo" non contribuisce alla discriminazione S-NS e non può spiegare l'origine dei linfociti T helper effettori, è indubbiamente interessante lo studio del ruolo dei fattori infiammatori nella modulazione della risposta immunitaria.

Questi fattori svolgono il loro ruolo a livello 2 (determinazione dei meccanismi effettori) modulando la quantità e la qualità della risposta dell'effettore. Molti sono noti e indicati come interleuchine e citochine.

E' importante sottolineare che non contribuiscono al livello 1 (v. fig. 1).

I FONDAMENTALI DELLA RISPOSTA UMORALE IL CONCETTO DI PROTECTON

Quali sono le attività che costituiscono la pressione operata dalla selezione evolutiva che ha modellato la risposta umorale?

Una risposta approfondita a questa domanda porta a nuovi concetti che possono sembrare poco credibili.

Le funzioni effettrici degli anticorpi dipendono dal tipo di immunoglobulina secreta. La concentrazione di anticorpi deve raggiungere una soglia minima efficace in un tempo sufficientemente breve per eliminare un agente patogeno prima che diventi letale.

Ciò richiede che inizialmente un numero sufficiente/equivalente di cellule B per ml risponda al patogeno. Questo numero di cellule B deve rispondere per ogni millilitro (o *altra unità di massa - ndr*) di tessuto organico. Di conseguenza, il sistema immunitario umorale deve essere reiterato, ossia costituito da multipli di questa semplice unità "autosufficiente".

Questa semplice conclusione ha implicazioni di vasta portata.

Prima di discutere delle implicazioni, diamo alcuni numeri approssimativi che illustrerebbero questo concetto.

Innanzitutto, è necessario raggiungere una concentrazione anticorpale soglia di 100 ng/ml entro 5 giorni per proteggersi dagli eventi peggiori causati da un agente patogeno.

Ciò richiederebbe inizialmente la presenza di circa 200 cellule B per ml specifiche per il patogeno. Questo "unità" dovrebbe essere presente per ogni millilitro di tessuto organico. In secondo luogo, l'unità reiterata deve essere sufficientemente diversificata all'interno per risultare protettiva nei confronti di una ampia varietà di agenti patogeni, con un tasso di fallimenti al massimo di 3 su 10^3 agenti patogeni.

In terzo luogo, c'è un limite al numero totale di cellule B per ml che è di circa 10^7 /ml per la maggior parte delle specie. L'unità reiterata, quindi, deve avere una dimensione quantitativa totale minima ad un valore di concentrazione fisiologicamente accettabile.

In conclusione, è realistico supporre che l'unità reiterata sia un totale di 10^7 cellule B per ml, con circa 200 cellule B /ml reattive per agente patogeno.

Abbiamo denominato questa unità di protezione reiterata come **Protecton**.

Il Protecton è il bersaglio della selezione evolutiva nel sistema immunitario umorale.

Considerate un toporagno pigmeo con 10^7 cellule B totali, un topo con 10^8 cellule B, un umano con 10^{12} cellule B e un elefante con 10^{14} cellule B. Questo si traduce in un toporagno pigmeo con 1 Protecton, un topo con 10 Protectons, un umano con 10^5 Protectons e un elefante con 10^7 Protectons.

Questi animali sono ugualmente protetti contro il loro universo di patogeni da un sistema immunitario umorale costituito da un sistema discreto organizzato per millilitro di tessuto, la cui somma protegge l'intero organismo. Tutti i Protectons sono equivalenti nella funzione di difesa.

Prima di affrontare le diverse implicazioni del concetto di Protecton, bisogna considerare quattro corollari collegati alla definizione di tale concetto.

1. Il Protecton è definito come il più piccolo campione del SI (sistema immunitario) umorale che conserva tutte le proprietà protettive selettive evolutive dell'intero SI di un organismo.
2. Mentre, per semplicità, abbiamo trattato i Protectons come unità indipendenti, c'è un fattore di cooperatività/scambio biologico-biochimico tra questi.
3. L'unità minima Protecton che abbiamo introdotto si basa sulla protezione contro la peggiore infezione batterica. Vi sono alcuni agenti patogeni eccezionalmente letali, specialmente quelli che producono tossine potenti, che sono deleteri oltre il controllo immunitario. Questi patogeni virulenti a crescita eccezionalmente rapida sono raramente incontrati dal SI e devono essere auto-limitanti per ragioni evuzionistiche, altrimenti non ci sarebbero vertebrati sopravvissuti. Poi, ci sono agenti patogeni che crescono con una dinamica relativamente lenta ma richiedono anticorpi rari e altamente specifici per limitarne la crescita. Un Protecton può essere organizzato sulla base della risposta immunitaria a determinati tipi di infezioni e nel caso di un patogeno a crescita lenta potrebbe richiedere fino a 10 o anche 20 giorni prima che venga raggiunta la soglia di concentrazione anticorpale efficace. Un Protecton per un agente patogeno a crescita lenta potrebbe essere costituito da 10^6 cellule e nel caso di un agente patogeno a crescita più rapida, più vicino a 10^8 cellule. Quindi, un Protecton è una quantità vettoriale che potrebbe essersi adattata nel corso dell'evoluzione in relazione ad alcuni agenti patogeni incontrati.
4. Il Protecton determina la dinamica del contatto primario con un agente patogeno. Questo è un passo chiave nella selezione evolutiva. Se la risposta di un sistema immunitario vergine non può proteggere contro un agente patogeno, non potrebbe esserci una risposta secondaria/anamnestic. La risposta secondaria è essenzialmente una riproduzione "veloce ed efficace" di una risposta primaria efficace, obiettivo diretto della selezione evolutiva di un organismo.

Conseguenze della teoria del Protecton

Analizziamo le conseguenze della teoria di un sistema immunitario umorale reiterato.

Gli immunologi hanno sempre considerato il sistema immunitario in grado di predisporre un repertorio indefinito/infinito per una risposta efficace.

I primi modelli di diversificazione potrebbero essere meglio descritti come una specie di "big bang".

Il repertorio era considerato come presente nella sua totalità come un unico "sistema" caratterizzato dall'espressione combinatoria di molti segmenti di V-geni codificati nella linea germinale, oppure V-geni frutto di una alta ricombinazione, oppure di V-geni frutto di una ipervariabilità mediante sostituzione casuale di minisegmenti genici nelle regioni dei determinanti la complementarità con l'antigene (v. **APPENDICE - Cenni di genetica delle immunoglobuline**, in fondo all'articolo).

Il cosiddetto "big-bang" costituito dai primi modelli di diversificazione sembrava descrivere le osservazioni, ma non teneva presente i meccanismi attivati o comunque collegati alla pressione evolutiva.

Noi abbiamo sostenuto che il repertorio deve essere espresso in due fasi.

STAGE I è un piccolo repertorio codificato nella linea germinale e rappresentato in un numero elevato di copie.

Questo repertorio fornisce il substrato per lo STAGE II, che è generato dalla diversificazione somatica (iper-mutazione) in copia singola.

Questa idea sulla formazione di un repertorio è stata fonte di numerose critiche in gran parte perché è costruita sulla **ipotesi della necessità evolutiva** e non è basata su osservazioni dirette.

Quando è stato definitivamente chiarito che era presente nel genoma un numero relativamente piccolo di segmenti del gene V, le teorie "big-bang" si sono rivelate erranee.

Poco tempo dopo il modello del "big bang" è stato rispolverato, quando è stata scoperta la diversità giunzionale e un ulteriore segmento ossia il gene D. Ciò ha permesso che si potesse ottenere un enorme repertorio ottenuto calcolando il numero di riarrangiamenti ottenibili per assortimento casuale dei segmenti genetici (calcolo combinatorio) per arrivare a dimensioni di repertorio superiori a 10^{10} . Ogni pubblicazione che si occupa del repertorio contiene questo calcolo definito con il termine 'completo' e comunemente utilizzato per avallare la enorme gamma di diversificazione ottenuta.

La teoria del Protecton ha reso questa ipotesi poco realistica.

Chiaramente la dimensione del repertorio disponibile non può essere superiore al numero di cellule B stabilito per ogni Protecton, cioè 10^7 . Per chiarire il concetto, si consideri un topo con 10^8 cellule B totali.

Se il repertorio necessario fosse 10^{10} (stima minima) e ognuna delle specificità contenute fosse importante per la protezione di un individuo, allora, in base al calcolo combinatorio, solo l'1% dei topi (Differenza fra la stima teorica 10^{10} ed il limite fisico del topo di 10^8 specificità possibili) esprimerebbe la specificità necessaria a contrastare un ipotetico antigene poco diffuso nell'ambiente e anche questo 1% non sarebbe protetto prima di un periodo di malattia di 30 giorni (calcolo statistico) affinché la singola cellula B specifica si moltiplicasse per raggiungere un livello protettivo.

Questi calcoli sono uguali per un essere umano con un repertorio di 10^{12} cellule B totali.

L'individuo esprimerebbe 10^2 cellule B totali specifiche per ogni agente patogeno, insufficienti per una protezione efficace in tempo utile.

I cosiddetti repertori "**trascendentali**" costituiti da un numero di specificità molto ampio ma finito sono dei modelli troppo rigidi in confronto di un **repertorio antigenico realmente infinito/indefinito**, capace di esprimere continuamente nuovi siti antigenici per mutazione; pertanto essi sono inadeguati a reggere la selezione per pressione evolutiva e destinati

all'estinzione.

Ritornando ora a una stima più realistica delle dimensioni del repertorio funzionale, il limite superiore in linea di principio è 10^7 B-cellule/ml; ma anche questo è sostanzialmente sopravvalutato.

Un'analisi della funzionalità del Protecton pone il repertorio a circa 5×10^4 . Questo repertorio è composto da un repertorio codificato dalla linea germinale (STAGE I) di circa 1×10^4 , e ciascuna specificità è presente in un numero elevato di copie ($\sim 10^2$ B-cellule per specificità per unità di Protecton) che evolve, nello STAGE II, in un repertorio derivato dal precedente per mutazione somatica di $\sim 4 \times 10^4$, caratterizzato da un basso numero di copie (1 cellula B per specificità per unità di Protecton).

Questi due repertori (germinale e somatico) interagiscono sinergicamente per fornire una risposta sufficientemente rapida a un'insieme molto ampio di agenti patogeni e dinamicamente mutevole per selezione evolutiva.

Il repertorio principale e l'universo antigenico

Come stima approssimativa, un repertorio vergine protegge l'individuo al 99%.

La strabiliante capacità di difesa del sistema immunitario è evidente se consideriamo gli individui immunodepressi a rischio di morte per l'azione dei cosiddetti agenti patogeni "opportunisti".

La teoria del Protecton evidenzia alcune caratteristiche delle funzioni effettrici molto importanti per la progettazione di vaccini e il trattamento passivo con le immunoglobuline.

Un anticorpo monoclonale può neutralizzare un agente patogeno o una tossina bloccando il sito di legame o inattivando un'attività enzimatica, ma è inefficace ad eliminare l'antigene. L'eliminazione è in gran parte effettuata dalla opsonizzazione, con la formazione di un aggregato tridimensionale di anticorpi e dalla successiva azione dei macrofagi.

A titolo di esempio, si consideri un antigene monomero come la tossina della difterite, del tetano o le tossine del colera. Un anticorpo monoclonale potrebbe neutralizzare la tossicità di questi antigeni, ma poiché non può formare un aggregato con l'antigene, non sarebbe in grado di inattivare efficacemente la tossina.

Due anticorpi monoclonali che reagiscono su differenti determinanti dei suddetti antigeni monomerici formerebbero una catena lineare anch'essa inefficiente per l'opsonizzazione. Occorrono 3 o più anticorpi che reagiscono con determinanti diversi per formare un aggregato tridimensionale su un antigene che così viene inattivato/eliminato in modo efficiente.

La neutralizzazione svolge un ruolo importante dando al sistema immunitario più tempo per rispondere e produrre una successiva serie di anticorpi efficaci alla eliminazione di un patogeno.

L'evoluzione seleziona in modo positivo i comportamenti più efficienti e anche se un anticorpo monoclonale che reagisce con un polimero potrebbe essere sufficiente per consentire l'aggregazione ed è più conveniente dal punto di vista energetico, il sistema generalmente vincente dal punto di vista evolutivo consiste nel legame con tre o più anticorpi indotti dai polimeri antigenici.

In sintesi anche se un anticorpo monoclonale interagisce con i virioni tramite un legame "non semplicemente lineare", l'efficacia dell'azione anticorpale dipenderebbe sempre dalla configurazione spaziale dell'antigene. Invece, se intervengono 3 o più anticorpi, il cross linking spaziale e la conseguente aggregazione polimerica è assicurata con inattivazione conclusiva.

Il repertorio di $\sim 5 \times 10^4$ specificità nel Protecton divide l'universo antigenico in epitopi distribuiti **casualmente e in combinazione sugli antigeni**.

Teorizzando una esplorazione tramite pacchetti di specificità anticorpali di dieci alla volta, secondo un calcolo fondamentalmente arbitrario, seppur matematico, il numero totale di antigeni distinguibili è $\sim 10^{43}$, un numero enorme ed efficiente per qualsiasi teoria.

Questo repertorio fallirà al massimo il riconoscimento di "3" su 1000 antigeni ed il numero di 10 epitopi "esplorati" per antigene (il pacchetto) è una stima basata su uno studio di modellazione informatica del Protecton.

Potrebbe sembrare sorprendente che un piccolo repertorio possa trattare l'universo antigenico. Si riassume in quattro punti il probabile meccanismo di funzionamento.

1. Il paratopo (sito di combinazione dell'anticorpo) è il primario obiettivo della selezione evolutiva. Solo i paratopi identificano una struttura come epitopo (determinante antigenico).
2. Un dato paratopo che reagisce con diversi epitopi distinti (fenomeno noto come crossreattività) si comporta funzionalmente con questi epitopi come se fossero un singolo epitopo. Qualsiasi anticorpo che riconosce un epitopo presente su un antigene self e un antigene non-self è definito dal sistema immunitario come auto-anticorpo o autoimmune e l'epitopo come un self-epitopo.
3. Simmetricamente, se un dato epitopo è riconosciuto da diversi paratopi (anticorpi) distinti (noto come fenomeno della degenerazione), il sistema immunitario tratta questa famiglia di anticorpi funzionalmente come un unico anticorpo.
4. Il paratopo è una "forma" cioè una struttura tridimensionale e una determinata "forma" del paratopo può essere determinata da molte strutture chimiche differenti. Ad esempio, un paratopo anti-carboidrato può essere in grado di reagire con un peptide (cross-reattività). Il riconoscimento dell'Ag è tridimensionale, non biochimico, e consente al repertorio paratopico di dividere l'universo di antigeni chimicamente diversi in un numero limitato di epitopi (*importanza fondamentale della cross-reattività - ndr*). I paratopi definiscono l'antigene come un insieme di epitopi distribuiti sulla molecola in modo combinatorio.

La struttura della risposta immunitaria ("classe" del Livello 2) Una questione irrisolta

In generale, un sistema immunitario funzionale risponde a un agente patogeno mediante una combinazione efficace a distruggerlo o renderlo inefficace.

Ciò che il sistema immunitario (SI) deve evitare è la possibilità che venga selezionata una risposta elaborata in modo casuale e quindi destinata ad essere spesso inefficace.

Pertanto il SI opera una selezione della risposta in grado di effettuare il riconoscimento di alcune proprietà dell'agente patogeno che attivino l'induzione di una classe di risposta efficace.

Il sistema immunitario può affrontare un agente patogeno in modo stereotipato o acquisito (da prec. attivazione) o con entrambi i meccanismi.

Come esempio di risposta stereotipata, c'è la risposta cellulo-mediata diretta a tutti i patogeni legati alle cellule (ad esempio i virus) mentre nella categoria acquisita c'è quella umorale rivolta a tutti i patogeni liberi (ad esempio i batteri).

Gli agenti patogeni legati alla cellula sono riconosciuti dalla ricognizione cellulare attivata in presenza di elementi di restrizione codificati nel complesso principale di istocompatibilità.

Nel caso di risposta acquisita, il sistema immunitario durante l'infezione deve selezionare la "classe" efficace nell'eliminazione del patogeno e inibire tutte le altre classi inefficaci (*una "classe" comprende il riconoscimento dell'antigene abbinato a un meccanismo effettore efficace - ndr*).

L'esatta conoscenza della organizzazione della risposta immunitaria avrà importanti conseguenze pratiche.

La capacità di poter agire sulla “classe” permetterà il controllo diretto di molte discrasie (*viene preconizzata l'attuale branca della immunoterapia - ndr*).

Ad esempio, il passaggio da una risposta efficace ad una inefficace consentirà il trapianto di tessuti, oppure il controllo dell'autoimmunità e delle allergie.

L'attivazione da una classe inefficace ad una efficace permetterà il trattamento di infezioni in cui il patogeno induce una risposta inefficace o una immunodepressione (HIV) così come la progettazione razionale di vaccini che inducono una classe efficace.

Osservare e comprendere le funzioni del Sistema Immunitario (SI)

Il principio guida deve essere basato su considerazioni evolutive.

Esiste una relazione dinamica tra la continua evoluzione della protezione immunitaria contro il carico patogeno e “l'escape” mutazionale del patogeno per evitare l'eliminazione.

Questo processo raggiunge un apparente stato stazionario ad un livello di protezione autolimitante ossia “efficace ma non dannoso” per l'organismo.

La conseguenza di questa autolimitazione è che nessuna proprietà del SI è assoluta o perfetta.

Esiste un limite al grado di specificità dei recettori, alla esclusione degli aplotipi, all'accuratezza della segnalazione biochimica tra le cellule, alla discriminazione S-NS, all'efficacia della funzione effettrice e così via.

Infine il SI potrebbe non essere in grado di elaborare una protezione per due motivi:

1. La risposta è troppo lenta perché il numero di cellule per ml che rispondono al patogeno sono troppo poche.
2. La funzione effettrice indotta è inefficace.

La vaccinazione e l'immunoterapia passiva possono incorrere nel primo problema attivando specificità nel repertorio che sono in frequenza troppo bassa per essere protettive con efficacia in una risposta primaria. Una delle cause possibili è che l'organismo viene vaccinato o immunizzato senza attivare tutti i meccanismi di risposta innata/acquisita che vengono mobilitati durante un'infezione reale, consentendo la elaborazione di una protezione dopo settimane e persino mesi spesso senza il coinvolgimento di alcune specificità fondamentali ma non attivabili perchè in bassa frequenza.

I trattamenti anticorpali passivi possono richiedere la sintesi anticorpi isolati mediante hi-tech ibridoma e metodologie di clonazione o da librerie combinatorie.

In questo caso può essere allestita una miscela di anticorpi per il trattamento che difficilmente potrebbe essere indotta dalla vaccinazione, e potrebbe non essere inducibile in vivo ma funzionale come assemblaggio di molecole effettrici (ad esempio, anticorpi con mutazioni nella struttura ed altri tipi di varianti). Ovviamente questi anticorpi possono essere teoricamente presenti nel repertorio potenziale ma non selezionabili nel processo evolutivo.

La vaccinazione e l'immunoterapia passiva richiedono che le specificità coinvolte siano collegate a funzioni effettrici efficaci.

Se non ci sono classi di risposta efficaci nell'eliminare il patogeno, allora qualsiasi intervento di immunizzazione sarebbe inutile.

Inutile ribadire che deve essere nota l'effettiva classe di risposta immune se si devono progettare vaccini e trattamenti anticorpali efficaci.

Gli interventi di cui sopra dipendono dalla comprensione e dalla conoscenza. Più conosciamo a fondo il sistema, maggiore è la probabilità di intervenire efficacemente.

APPENDICE

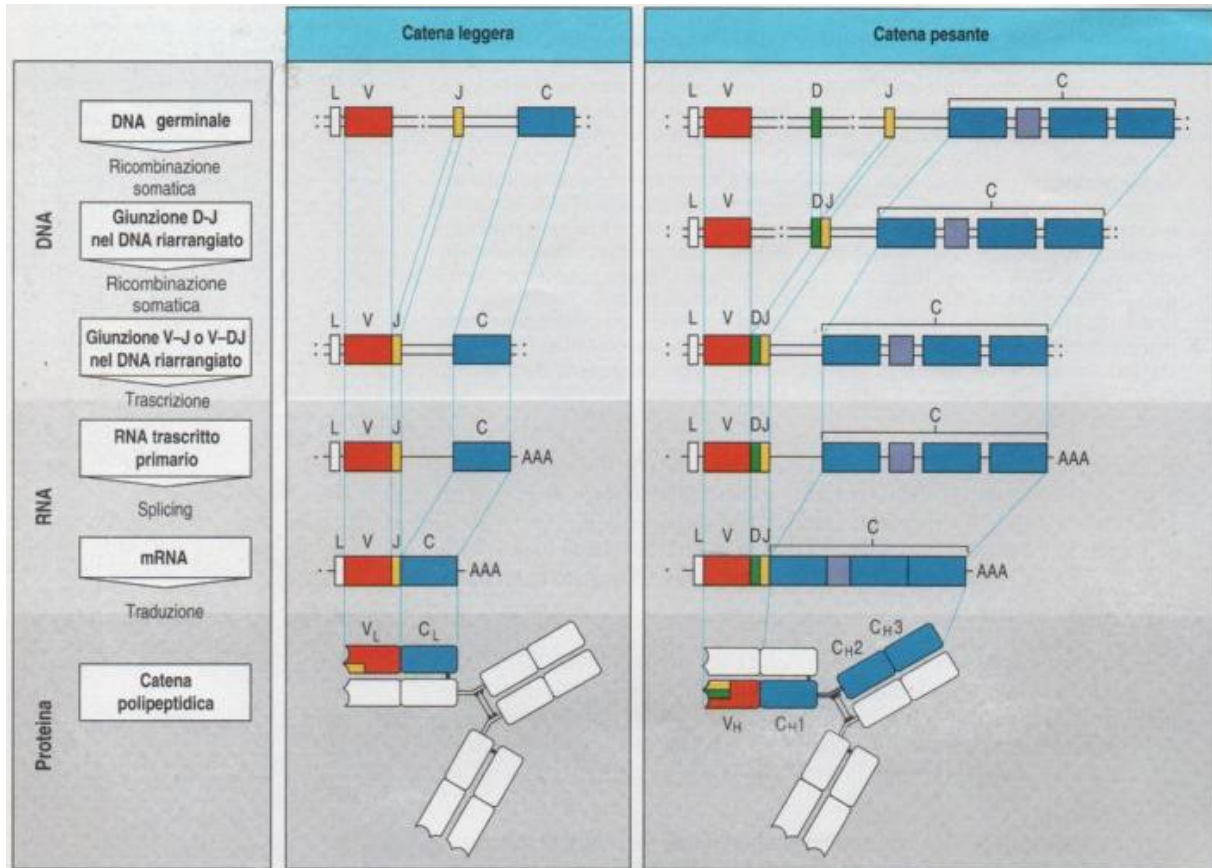
Cenni di genetica delle immunoglobuline
(da C. A. Janeway et al... Immunobiologia, 5^a ed.)

Il meccanismo dell'immunità acquisita: la ricombinazione dei geni e l'ipermutazione somatica

La straordinaria diversità del repertorio delle immunoglobuline è ottenuta attraverso vari meccanismi. Probabilmente la causa principale di questa diversità deriva dal fatto che le regioni V sono codificate da segmenti genici separati (segmenti genici V D e J) che sono riuniti da un processo di ricombinazione somatica [ricombinazione V(D)J], per formare un esone completo della regione V.

Nel genoma di un individuo sono presenti molti segmenti genici diversi; essi forniscono una fonte ereditaria di diversità che questo meccanismo combinatorio può usare. Le uniche ricombinasi specifiche per i linfociti, le proteine RAG, sono assolutamente necessarie per catalizzare questo riarrangiamento genetico e l'evoluzione delle proteine RAG è coincisa **con la comparsa del sistema immunitario acquisito moderno nei vertebrati**. Un'altra parte sostanziale della diversità funzionale delle immunoglobuline proviene dallo stesso processo di unione. La variabilità nei punti di giunzione fra i segmenti genici è generata dall'aggiunta di un numero casuale di nucleotidi P e N e dalla delezione variabile di nucleotidi alla fine di alcuni segmenti. L'associazione di regioni V variabili delle catene leggere e pesanti diverse fra loro, organizzata per formare il sito di legame per l'antigene di una molecola immunoglobulinica, contribuisce a una diversità ulteriore. La combinazione di tutte queste fonti di diversità genera un vasto repertorio primario di specificità anticorpali. Ulteriori cambiamenti nelle regioni V riarrangiate, introdotti per ipermutazione somatica, aggiungono una diversità ancora maggiore a questo repertorio primario.

Figura A - I geni delle regioni V originano partendo da segmenti genici.



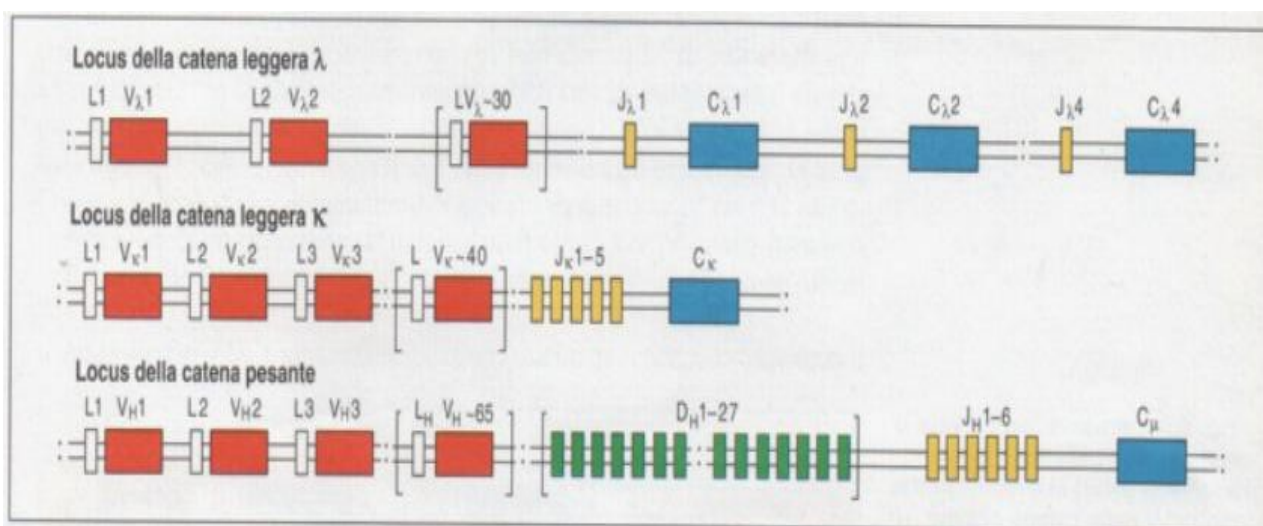
I geni della regione V delle catene leggere sono formati da due segmenti (riquadro centrale). Un segmento variabile (V) e uno di giunzione (J) presenti nel DNA genomico sono congiunti in modo da formare l'esone completo per la regione V della catena leggera. Le catene immunoglobuliniche sono proteine extracellulari quindi il segmento V è preceduto da un esone che codifica il peptide guida (L dall'inglese Leader) che dirige la proteina lungo la via metabolica che porta alla secrezione e che verrà poi rimosso. La regione C della catena leggera è codificata da un esone separato e la rimozione degli introni fra L e V e fra J e C avviene durante la maturazione dell'mRNA. Le regioni V delle catene pesanti sono formate partendo da tre segmenti (pannello di destra). Inizialmente si congiungono i segmenti D (da Diversity= diversità) e J, quindi si lega il segmento V in modo da formare l'esone completo V_H . Vi sono molti esoni diversi che possono codificare la regione C della catena pesante. Gli esoni C e l'esone L sono legati alla sequenza del dominio V durante il processo di maturazione dell'RNA della catena pesante. La sequenza guida viene tagliata dopo la traduzione e si formano quindi i legami disolfuro fra le catene. La regione cerniera è colorata in viola.

Tabella – Numero di segmenti genici funzionali nei loci delle immunoglobuline umane

Segmento genico	Catene leggere		Catene pesanti
	k	λ	H
Variabile (V)	34 - 38	29 - 33	38 - 46
Diversità (D)	---	---	23
Giunzione (J)	5	4 - 5	6
Costante (C)	1	4 - 5	9

Questi numeri sono stati ottenuti dopo clonaggio e sequenziamento del DNA derivato da un individuo, eliminando tutti gli pseudogeni (cioè le versioni mutate e non funzionali di una sequenza genica). A causa dei polimorfismi genetici, i numeri non sono gli stessi in tutti gli individui.

Figura B - L'organizzazione germinale nell'uomo dei loci per le catene pesanti e leggere delle immunoglobuline.

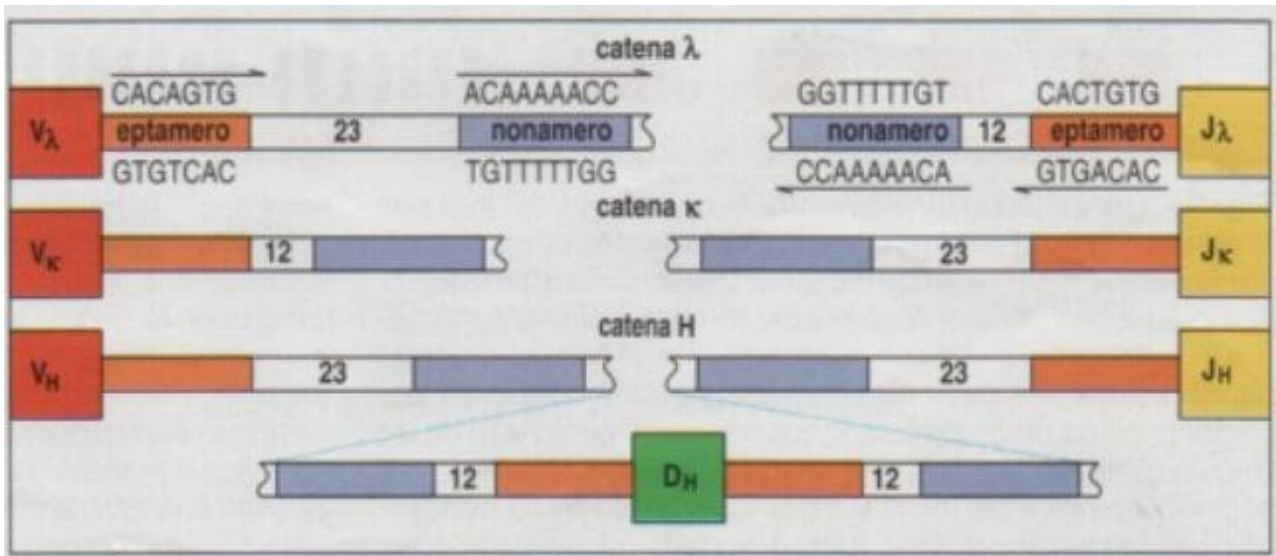


Il locus per le catene leggere λ (**Cromosoma 22**) ha circa 30 segmenti genici funzionali V_{λ} e quattro coppie formate dai segmenti genici J_{λ} e dai geni C_{λ} .

Il locus per le catene leggere κ (**Cromosoma 2**) ha una organizzazione simile, ha circa 40 segmenti genici V_{κ} funzionali accompagnati da un gruppo di cinque segmenti genici J_{κ} e da un singolo gene C_{κ} . Nel 50% dei soggetti, l'intero complesso dei segmenti genici V del locus κ è duplicato (nella figura non viene mostrato per semplicità).

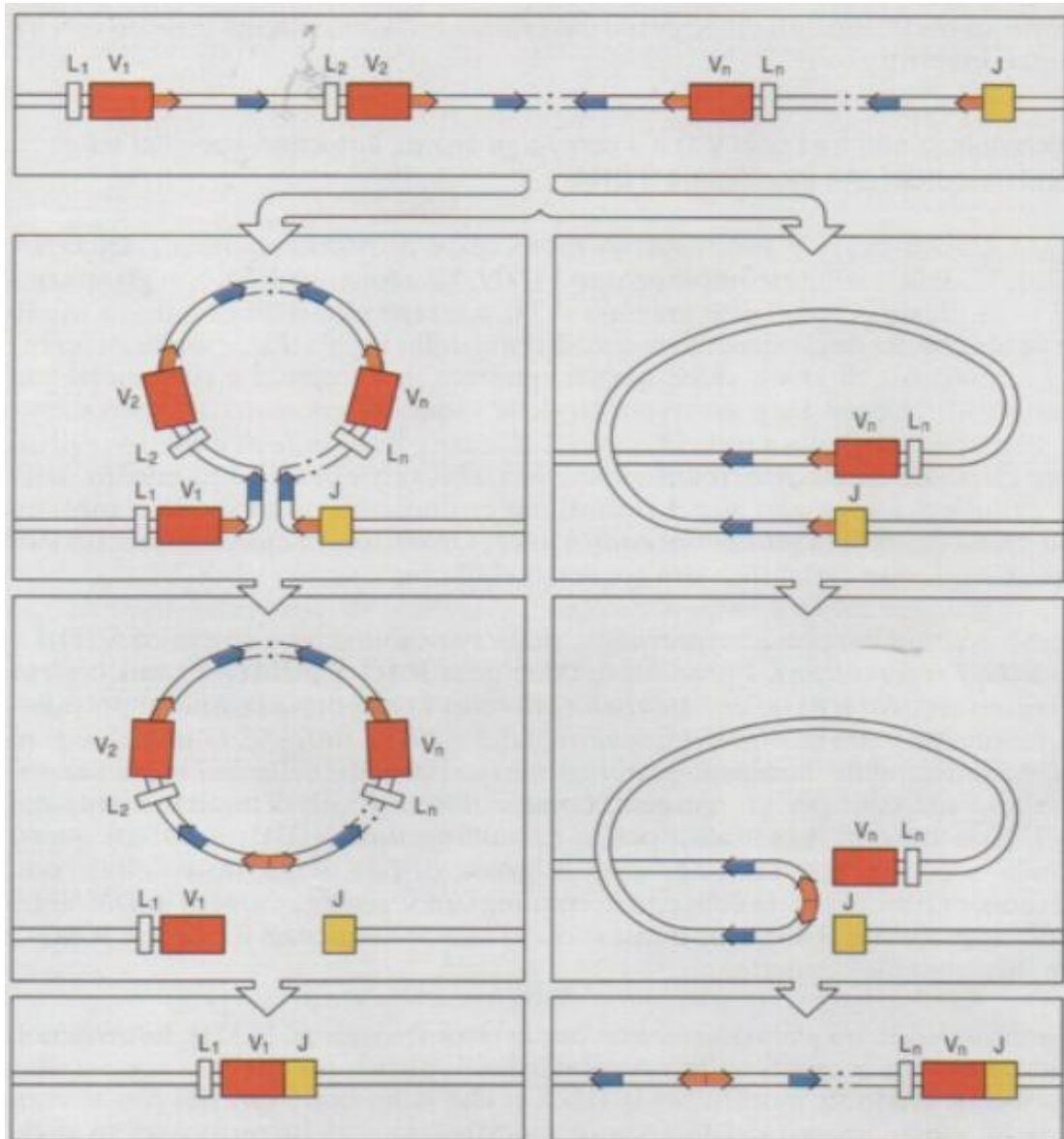
Il locus per le catene pesanti (**Cromosoma 14**) ha circa 65 segmenti genici V_H funzionali e un gruppo di circa 27 segmenti D posti fra i segmenti genici V_H e i sei segmenti J_H . Il locus per le catene pesanti contiene anche un gruppo di geni C_H che qui non vengono descritti. Per semplicità, viene mostrato un solo gene C_H senza gli esoni separati, non vengono riportati gli pseudogeni e tutti i geni V hanno lo stesso orientamento. L (da 1 a n) è la sequenza guida. L'immagine non è in scala: la lunghezza totale del locus per le catene pesanti è di oltre 2 megabasi (2 milioni di basi), mentre alcuni dei segmenti D sono lunghi solo 6 basi.

Figura C - Sequenze conservate di sette (eptamero) o nove (nonamero) basi fiancheggiano i segmenti genici che codificano le regioni V delle catene pesanti (H) e leggere (k e λ).



Lo spazio (bianco) compreso fra gli eptameri (arancio) e i nonameri (viola) può approssimativamente essere sempre di 12 o di 23 paia di basi, e la giunzione avviene quasi sempre a livello della sequenza segnale di ricombinazione di 12 e 23 pb.

Figura D - I segmenti genici della regione V sono riuniti grazie alla ricombinazione.



Durante ciascun evento di ricombinazione della regione V, le sequenze segnale che fiancheggiano i segmenti genici entrano in contatto in modo che possa avvenire la ricombinazione. Per semplicità nella figura è riportata la ricombinazione di una catena leggera, infatti nelle catene pesanti, per generare una regione V funzionale, sono richieste due ricombinazioni. In alcuni casi, come mostrato nei pannelli di sinistra, i segmenti genici V e J hanno lo stesso orientamento trascrizionale. La sovrapposizione delle sequenze segnale di ricombinazione porta alla formazione di un'ansa contenente il DNA compreso fra le due. Gli eptameri sono colorati in arancione e i nonameri in viola, le frecce indicano l'orientamento di queste sequenze di ricombinazione (vedi Fig. C). La ricombinazione avviene alla fine della sequenza eptamerica, in questo modo si forma un segnale di giunzione e viene rilasciato il DNA interposto sotto forma di struttura circolare chiusa. Successivamente, la formazione del legame fra i segmenti genici V e J forma la sequenza codificante di giunzione. In altri casi, come illustrato nei pannelli di destra, i segmenti genici V e J hanno inizialmente le sequenze trascrizionali orientate in direzioni opposte. Per avvicinare le sequenze segnale, occorre che il DNA assuma una struttura ad ansa più complessa. La riunione delle terminazioni delle sequenze eptameriche comporta l'inversione e l'integrazione della sequenza di DNA. Ancora una volta la giunzione dei segmenti V e J crea un esone funzionale per la regione V.

Riferimenti bibliografici

1. RE Langman: The Immune System, Academic Press, San Diego, California (1989)

Economia molecolare e funzione anticorpale: elaborazione della teoria del Protecton

International Journal of Clinical and Laboratory Research

March 1992, Volume 22, Issue 1–4, pp 63–68

Rodney Eric Langman (2/2/1944 - 13/8/2002)

Developmental Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA
92186-5800, USA

Sunto

La risposta immunitaria umorale protegge da una vasta gamma di agenti patogeni che tentano di sfuggire al riconoscimento immunitario modificando la struttura antigenica.

Quando si confrontano due insiemi di DNA in competizione (vale a dire, i patogeni contro l'ospite), si rende evidente l'enorme differenza quali-quantitativa del pool di DNA patogeno mutante rispetto al DNA dedicato alle difese immunitarie in qualsiasi organismo, tanto più quanto più ridotte siano le sue dimensioni, ad esempio, in un topo.

Vengono analizzati gli stratagemmi che consentono a una piccola frazione del genoma del topo di competere efficacemente con una gamma estremamente diversificata di agenti patogeni, in termini di capacità di attivare le funzioni anticorpali evitando di incorrere nelle dinamiche autoimmunitarie o in un eccesso di risposta che può degenerare in autodistruzione (v. shock anafilattico, etc...).

Questa recensione è una descrizione generale di una lunga serie di articoli che descrivono l'elaborazione della teoria del Protecton.

E' incontestabile che l'efficacia della funzione anticorpale dipenda dalla loro concentrazione, così come è evidente che il repertorio degli anticorpi funzionali debba essere relativamente piccolo, il che significa agevolmente e rapidamente selezionabile affinché sia prodotta una concentrazione sufficiente di anticorpi specifici in tempo utile per eliminare un pericoloso agente patogeno.

Pertanto, la cifra comunemente citata dai testi di immunologia della stima dell'ampiezza del repertorio di diversità anticorpale nell'intervallo che va da $> 10^{10}$ a "indefinito/infinito(?)" deve essere seriamente in errore.

Altri ben noti "fatti", come la diversità D (riarrangiamento genico VDJ nella catena pesante di un anticorpo) e la segnalazione tramite citochine della cellula B da aggregazione del recettore con l'antigene, sono "biologicamente insufficienti" a spiegare la capacità di risposta del sistema immunitario (SI) all'universo antigenico.

Introduzione

Questo saggio è basato su un lavoro di 5 anni (nel 1992) in collaborazione con il dr Melvin Cohn nel Dipartimento di Ricerche Biologiche del Salk Institute di San Diego – California.

Il primo scopo è stato quello di collegare le conoscenze molecolari sugli anticorpi al meccanismo d'azione dei medesimi.

Il lavoro fondamentale dal quale viene estrapolato questo saggio e che contiene una spiegazione dettagliata dei punti, e i calcoli esatti qui trattati in modo generico, insieme alle critiche dei nostri colleghi, è "*Il protecton: una unità umorale selezionata dall'evoluzione*" [Immunol. Rev. 115:7,1990].

Un approfondimento delle idee esposte può essere letto nel testo "The immune system" Langman R.E. Academic Press San Diego - 1989 e accennato in alcuni testi di immunologia (es. Janeway...)

Premessa

Il sistema immunitario (SI) è uno dei tanti meccanismi di difesa contro le malattie infettive. Principio fondamentale evolutivo è che il sistema immunitario si inserisce nella gamma dei meccanismi di difesa, tramite la capacità “rivoluzionaria” di operare una discriminazione self-nonself (SNS) che non è codificata nella linea germinale ma viene effettuata con “l'elaborazione somatica della risposta, ossia tramite l'immunità acquisita”.

I batteri, per esempio, usano l'endonucleasi di restrizione come un meccanismo di difesa anti-virale che identifica il DNA estraneo come diverso dal loro; questo è un esempio di discriminazione SNS **ereditata, ossia codificata dalla linea germinale**.

Ridotta ai principi fondamentali, la risposta immunitaria umorale (anticorpo-mediata) è diretta contro parassiti extracellulari mentre la risposta immunitaria cellulo-mediata contrasta gli effetti dei parassiti intracellulari, (eliminazione delle cellule infette ed in generale diverse).

Anche senza essere a conoscenza dei meccanismi di produzione anticorpale dei linfociti B e degli effetti citotossici dei linfociti T, l'osservazione scientifica dell'attività del SI ci obbliga a postulare, a priori, due classi di risposta immunitaria corrispondenti alle due classi d'azione dei patogeni (extra ed intracellulare), ognuna delle quali richiede tipologie molto diverse di meccanismi effettori di difesa.

La differenza fra una discriminazione codificata nei geni (innata) e quella operata dall'immunità acquisita può essere illustrata con il seguente esempio:

- la generazione di 2 genitori AA e BB sia rappresentata da una prole (AB)F1.
- I trapianti di tessuto di (AB)F1 sui genitori verranno accettati da AA e BB se la discriminazione SNS viene operata da un SI innato mentre verranno rigettati da entrambi se i loro SI subiscono una post-elaborazione “somatica” (immunità acquisita).
- La differenza fondamentale risiede nel fatto che una identità antigenica (anche se solo a “metà”) è sufficiente per la tolleranza nel SI innato, mentre per il SI somaticamente acquisito una diversità “anche parziale” è sufficiente per il rigetto.

Quindi se la risposta immune fosse il frutto di una discriminazione operata da un SI solo innato (codificato dalla linea germinale e sottoposto ad adattamento solo per pressione evolutiva, con il rischio di fallimento ed estinzione) non potrebbe verificarsi l'eliminazione della cellula infetta che noi osserviamo costantemente in natura, ma solo tentativi di bonifica e riparazione tramite sistemi diretti esclusivamente contro l'agente patogeno, lasciando alla situazione circostante/ambientale (pressione evolutiva) il compito di eliminare questo organismo.

Quindi un meccanismo di discriminazione che classifichi come estraneo ciò che presenta, nell'ambito di un “abito antigenico simile”, alcune diversità cioè un parziale aspetto non-self non può essere semplicemente ereditato ma il frutto di un meccanismo acquisito durante la maturazione somatica del SI.

In breve, il SI (sistema immunitario) non eredita solo sistemi semplici di difesa come gli enzimi di restrizione/riparazione o di inibizione della traduzione/trascrizione ma anche un complesso ed elastico sistema di riconoscimento (perfezionato in milioni di anni) che, nel contatto con l'antigene, è soggetto a modifica/selezione clonale e memorizzazione della risposta immunitaria - ndr.

In conclusione l'eliminazione del nonself (che può essere anche una cellula trasformata) negli organismi complessi viene operata tramite il sistema dell'immunità acquisita che diventa l'elemento centrale dell'omeostasi immunologica e dell'intero SI.

Il sistema immune acquisito si fonda sul teorema “Una cellula costruisce un solo anticorpo”

Un anticorpo non viene sintetizzato con la proprietà di discriminazione fra un antigene proprio (self) ed un antigene estraneo/parassitario (nonself). Se così fosse la discriminazione sarebbe genetica (codificata nella linea germinale) cioè “innata”.

Questa discriminazione di tipo binario (on-off) viene attuata dai linfociti B, la sorgente degli anticorpi, a seguito di un'elaborazione “acquisita” della risposta immunitaria.

Tuttavia, una cellula B che produce due anticorpi diversi, codificati dai due cromosomi del corredo genetico diploide, non ha modo di determinare quale dei suoi geni ha prodotto un anticorpo efficace, inefficace o dannoso (autoanticorpo).

Pertanto, vi è la necessità per le cellule B di esprimere una singola specificità anticorpale - fenomeno chiamato “esclusione dell'aplotipo”.

L'adagio “una cellula B - un anticorpo” è il risultato di un meccanismo di esclusione aplotipica che è *sufficiente ed efficiente*, in quanto il sistema produce, nella maggior parte dei soggetti di una specie, scarse quantità di autoanticorpi. Una eliminazione totale di tutti gli autoanticorpi è un meccanismo evolutivamente non selezionabile, altrimenti dovremmo ammettere una predeterminazione innata della scelta binaria, cioè dell'esclusione aplotipica.

Una volta attuata l'esclusione aplotipica, la cellula B che produce in tal modo un solo anticorpo viene assoggettata a selezione positiva/negativa a seconda che l'anticorpo sia eterodiretto verso il nonself o verso il self. Senza questo passaggio fondamentale, potrebbero essere presenti in un individuo cellule B capaci di funzione protettiva e di danno autoimmune **contemporaneamente**.

L'orientamento della produzione anticorpale nel senso della difesa e non dell'autoimmunità viene attuato da meccanismi che noi oggi conosciamo molto bene, ossia la stimolazione attuata tramite la APC (antigen presenting cells) verso gli antigeni non-self a la eliminazione timica/midollare della maggior parte delle cellule che reagiscono contro il self. Il problema di fisiologia naturale, che scaturisce immediatamente da un semplice e logico ragionamento, è molto serio:

come può essere protetto con la medesima efficacia un girino (cell.B totali 10^6) ed un elefante (cell.B totali 10^{14}) ?

Può sembrare logico pensare che la variabilità anticorpale sia molto più ampia ed efficace in un elefante se consideriamo unicamente la legge

“una cellula B, un anticorpo”

L'unica arma in possesso degli animali di minima taglia sarebbe il numero di individui per poter competere con l'universo antigenico, ma nel corso delle centinaia di milioni di anni si sarebbe dovuto verificare una estinzione dei piccoli animali, ed una presenza preponderante di animali di grossa taglia, evento che non è mai avvenuto, anzi di fronte a catastrofi naturali sono questi ultimi ad essere in pericolo.

Sorgono spontanee 2 semplici deduzioni che possono risolvere questo problema.

1. Il comparto umorale dell'immunità non funziona per quantità totale di cellule B operanti, ma per concentrazione (cell.B/ml oppure Ab/ml) (2), prendendo in considerazione come unità di volume il ml (*unità arbitraria che verrà contestata da altri immunologi – ndr*)
2. Non può esistere una variabilità anticorpale pari alla variabilità (praticamente infinita) dell'universo antigenico

Una semplice deduzione collegata alla osservazione n° 2 è che la protezione fornita dal sistema umorale si deve obbligatoriamente basare sulla capacità degli anticorpi a reagire verso più antigeni (*reattività aspecifica o crociata, che spesso verificiamo nei tests di laboratorio*).

Questa caratteristica, selezionata dalla pressione evolutiva (ossia maggior probabilità di

sopravvivenza per le specie in grado di attuare meccanismi di difesa “polivalenti”) può giustificare l'aumento della probabilità di una produzione di autoanticorpi, distribuita all'interno della specie in forma gaussiana (da normale fino a patologica).

La prova più evidente di questa deduzione è che la risposta anticorpale ad un antigene non è monotona ma è costituita da famiglie di anticorpi differenti per avidità ed affinità, di cui una parte è in grado di reagire aspecificamente verso altri antigeni, spesso in modo casuale e non perchè correlati ossia appartenenti ad agenti patogeni consimili.

L'esempio più eclatante è costituito dagli anticorpi diretti contro i gruppi sanguigni (antiA, antiB, antiRH), frutto di una reazione di difesa verso microbi intestinali e capaci di questa reazione crociata; questi anticorpi non sono soppressi perchè diretti verso autoantigeni (i gruppi) che non sono presenti sulla superficie dei globuli rossi dell'ospite - ndr.

La protezione umorale funziona per concentrazione e non per massa totale

Gli eventi infettivi affrontati da un topo e da un elefante sono approssimativamente gli stessi, non tanto in relazione al tipo di agenti causali, quanto per frequenza di contatti/incidenti nel tempo (l'unità di tempo viene rapportata proporzionalmente alla loro vita media).

Nonostante la differenza di mole e proporzionalmente di cellule immunocompetenti (100 milioni di cellule immuni nell'elefante per ogni cellula immune di topo) ambedue gli organismi hanno pressapoco la stessa probabilità di sopravvivenza in caso di infezione con un'agente patogeno.

E' intuitivamente corretto pensare che qualsiasi Sistema Immunitario si basa su di una unità di protezione “cellulo-umorale” per unità di volume (*arbitrariamente viene scelto il ml e le sue frazioni o multipli – ndr*) che similmente ad un bit informatico può essere variamente combinato con unità simili in numero proporzionale alla massa dell'organismo. Tale unità teorica, elaborata anche tramite l'ausilio di un programma informatico, è stata denominata Protecton da R.E. Langman e M. Cohn.

Lo sviluppo concettuale (matematico e biologico) di questa unità di protezione conduce ad un riesame profondo delle classiche concezioni del Sistema Immune.

Per evitare di incorrere in conclusioni errate o ingiustificate gli AA hanno sempre inquadrato le loro ipotesi in un contesto di una logica evolutiva quale migliore strumento di conferma teorica.

In letteratura è descritto che la concentrazione minima di anticorpi in vivo per una risposta efficace ad uno stimolo antigenico a basso livello è in media di 10 ng/ml (range compreso fra 1 ng/ml --- 100 ng/ml) laddove si definisce la concentrazione di 100 ng/ml come **“la concentrazione anticorpale utile per neutralizzare la massima carica antigenica sopportabile da un organismo”**.

Con ragionevole approssimazione si può assumere che, nello sforzo di produzione di una concentrazione anticorpale media come descritta, si può verificare la sintesi contemporanea di una concentrazione max approssimativa < 1 ng/ml di autoanticorpi che è perfettamente tollerabile da qualsiasi organismo.

Si può affermare che, entro questo range, esiste sicuramente la soglia di una concentrazione anticorpale efficace: una scelta non ragionata e poco logica di tale parametro può condurre a conclusioni erronee verificabili, ove possibile, per via sperimentale.

Per esempio, se la soglia di protezione immunitaria richiesta è ai massimi valori suesposti (100 ng/ml) ne scaturisce che la concentrazione di linfociti B/ml necessaria per sintetizzare tale livello anticorpale può essere derivata sulla base della velocità nota della secrezione anticorpale nelle linee cellulari mielomatose (produzione di 10 pg Ab/ cellulaB/ die) e corrisponde in toto ad una concentrazione approssimativa di 10^4 B cell/ml in grado di

sostenere una produzione di 100 ng anticorpi /ml /24 ore.

Ammissa la possibilità teorica di una divisione cellulare ogni 12 h per le cellule B, occorrerebbero 13-14 duplicazioni (ossia 6 – 7 giorni) affinché una cellula B capace di produrre un anticorpo altamente specifico ad uno stimolo antigenico appropriato, riesca a creare una progenie di cellule di circa 10^4 B cell/ml.

Normalmente verificiamo che la concentrazione necessaria per far regredire la progressione di una tipica infezione batterica viene normalmente raggiunta in 4 – 5 giorni (diversa la situazione delle malattie virali dove si aggiunge e spesso è preponderante l'immunità cellulomediata) e questo implica una concentrazione iniziale di ≈ 10 cellule B/ml specifiche per l'antigene.

Altre ricerche in letteratura dimostrano sorprendentemente in varie specie (dal girino all'elefante) una concentrazione costante di 10^7 B cell/ml (media estrapolata da osservazioni che collocano il dato fra $> 10^6$ e $< 10^8$ B cell/ml).

Da queste osservazioni si può calcolare un range del repertorio di B cellule variabile da 10^6 /ml a 10^7 /ml, dove assumiamo in linea logica ma teorica che in 10^6 /ml vi sia una cellula B specifica per l'antigene.

In caso di 10^7 /ml cellule B si calcola la presenza di 10 diverse cellule B specifiche / antigene.

In generale, chi si occupa di immunità umorale sa che il calcolo basato sulle possibili combinazioni della variabilità delle sequenze aminoacidiche delle varie regioni del sito combinatorio di un anticorpo (V x D x N x J) restituisce un possibile repertorio di 10^{12} Ab con diversa specificità antigenica (4, 5, 9).

(per una migliore comprensione di questo e dei segg. capitoli si consiglia di leggere nell'Appendice del precedente articolo i "Cenni sulla genetica delle immunoglobuline" - ndr)

Nelle ricerche che conducono a queste conclusioni non è mai stato affrontato, con uno stretto senso della realtà, il problema della disparità fra il repertorio teorico di 10^{12} specificità ed il repertorio espresso da animali di piccola taglia come il topo (che possiede un numero di B cellule **totali** di 10^8) e che comunque si dimostrano vincenti in un ottica strettamente evolutiva.

Non bisogna dimenticare che entro un repertorio di 10^7 /ml specificità deve allocarsi una dinamica giornaliera di funzionamento sufficiente per superare un insulto antigenico entro i 4 – 5 giorni osservati nei processi naturali.

Non esiste alcuno studio che dimostri come l'evoluzione abbia potuto superare questo gap, anche se, dati alla mano, lo ha realmente fatto.

Come superare la differenza fra il calcolo combinatorio delle variabilità teorica in base alla sequenza aminoacidica (10^{12} specificità) ed il calcolo pratico per concentrazione di un repertorio di circa 10^7 /ml specificità?

Per ampliare la valenza di un repertorio per concentrazione di circa 10^7 /ml specificità, occorre considerare un altro aspetto funzionale degli Anticorpi, cui abbiamo suaccennato, ossia la costituzione di una famiglia anticorpale eterogenea (diretta contro un complesso antigenico rappresentato dall'agente patogeno) costituita da anticorpi a differente affinità ed avidità.

I problemi inerenti l'affinità, che usualmente complicano qualsiasi calcolo sulla funzionalità del repertorio, non sono presenti nelle nostre ricerche perchè, ai fini dei calcoli sul repertorio, vengono presi in considerazione solo gli Ab di affinità sufficiente (o superiore) per agire con efficienza alla soglia di 10 ng/ml.

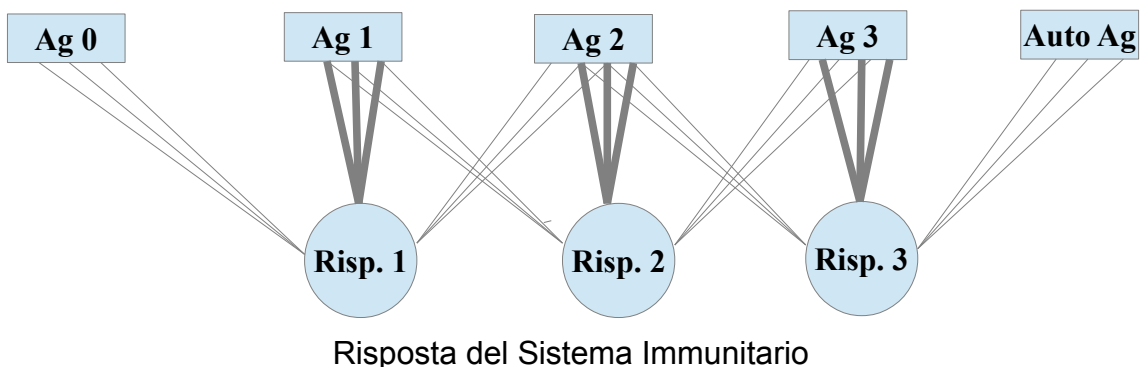
Ma si può argomentare che gli anticorpi siano presenti in concentrazioni differenti in base alla efficacia della loro azione, ossia che un Ab con affinità 10X possa essere presente in

concentrazione 1/10 rispetto ad un Ab con affinità 1X e questo discorso si ribalta specularmente sulle B cellule produttrici (in base alla legge una cellula = 1 anticorpo) ossia la probabilità che una tale cellula B ad alta affinità sia presente nel repertorio è almeno dieci volte inferiore.

L'intrigante corollario della teoria del Protecton (- NDR)

La teoria del Protecton pone limitazioni alla vastità del repertorio anticorpale, per motivi che potremmo definire di fisiologia naturale, ossia per teorizzare un S.I. capace di essere protettivo in sistemi viventi estremamente diversi fra di loro, e che, come asseriscono gli AA, consta in un repertorio di specificità anticorpali ben al di sotto della quota ricavata con il calcolo combinatorio (centomila volte inferiore) ed organizzato **per concentrazione** e non per quantità assoluta. Per pura curiosità, ammessa la concentrazione di 10^7 specificità /ml, osserviamo una quota di 10^{12} specificità in un organismo con un volume di 100000 ml cioè 100 lt. Tutti gli esseri viventi con un volume di una tonnellata contengono 10^{13} specificità

Da questa limitazione, scaturisce una semplice deduzione logica su come viene organizzata ogni risposta anticorpale a qualsiasi stimolo antigenico, anche se singolo (evento eccezionale, visto che un agente patogeno o un allergene qualsiasi è costituito da un mosaico antigenico): la risposta anticorpale risulta costituita da un ventaglio di risposte con un range che varia da parzialmente ad altamente specifica e che alle regioni estreme si può incrociare con antigeni scarsamente correlati o anche autoantigeni (reazioni crociate, Ab eterofili, etc...).



L'incrocio rappresentato nella figura è semplice e schematico e nella realtà può essere molto complesso, con reazione crociate multiple anche inaspettate (v. gruppi sanguigni).

Il concetto guida di questo corollario è che si elimina l'agente e si supera la malattia per il concorso contemporaneo di risposte a specificità ampiamente variabile.

Pertanto possiamo pensare che la teoria del Protecton costituisca un'ottima piattaforma per 2 tipi di teoria della memoria:

- la teoria della memoria eterologa e policlonale
- la teoria dell'antigene residuo

(vedi I sezione degli appunti di Immunologia).

Un secondo corollario che può essere formulato, anche se meno evidente e alquanto azzardato, consiste nel presupporre che, nella realtà naturale (non sempre ben rappresentabile in vitro) gli anticorpi selezionati dal contatto con l'antigene raramente siano al massimo livello di affinità (sforzo che richiederebbe un repertorio financo superiore alle 10^{12} specificità teoriche e che potrebbe agevolare anche una significativa quota di autoanticorpi) ma a livelli intermedi tali da soddisfare la soglia minima di Ab specifici alla concentrazione efficace per guarire (10 ng/ml): tutto questo verrebbe realizzato tramite un gioco biologico di standby pilotato dalla diminuzione della

concentrazione antigenica ottenuta proporzionalmente all'efficacia della risposta immunitaria.

A conferma di quanto immaginato si può invocare l'affermazione degli autori che sostengono che le B cellule in grado di sintetizzare anticorpi con affinità 10x sono rappresentate nel repertorio alla concentrazione di 1/10 rispetto a quelle 1x e quindi possono avviare una difesa efficace in tempi teoricamente 10 volte più lunghi rispetto alle B cellule 1x.

Il loro coinvolgimento potrebbe non essere necessario ai fini della guarigione grazie ad una rapida eliminazione dell'antigene ottenuto tramite famiglie anticorpali meno affini ma più veloci nel raggiungere la quota anticorpale minima efficace (perchè presenti nel repertorio ad alta concentrazione).

Si tratta di ipotesi non facilmente verificabile e comunque non escluderebbe la stimolazione e clonazione di cellule B ad alta affinità.

Le basi molecolari dell'esclusione aplotipica

E' noto che i geni che codificano per la catena pesante e quella leggera di un anticorpo sono allocati in diversi piccoli frammenti genomici (v. *prec. articolo, Appendice - Cenni di genetica delle immunoglobuline*) (9).

La catena pesante H è prodotta dai segmenti genomici V, D, J, C, mentre la catena leggera L viene prodotta dai segmenti genici V, J, C (non c'è segmento D).

Gli eventi di fusione genica, che collegano un segmento V a un segmento J, sono notoriamente soggetti a errori e questa è una parte essenziale del meccanismo di esclusione aplotipica.

Gli errori di giunzione sono causati dalla fusione genica che si verifica all'interno delle regioni codificanti degli esoni V e J. Un errore di inserzione di una singola base nella giunzione causa una mutazione nella struttura di lettura (ORF), con conseguente interruzione prematura della catena nella regione genomica C e inattivazione del gene.

Questi incidenti casuali nella struttura di lettura alla giunzione V-J conducono al risultato che solo un terzo delle giunzioni V-J è leggibile (*e traducibile in un segmento proteico - ndr*) e in grado di produrre una catena L o H intera (il numero di probabilità 1/3 deriva dal fatto che una inserzione errata di un aminoacido dipende da un codone cioè da una tripletta di basi quindi da 3 possibilità di errore).

Lo sviluppo aritmetico ci suggerisce che la probabilità di avere due cromosomi produttivamente riarrangiati sia nel locus della catena H, sia nel locus della catena L è uguale a $1/3 \times 1/3$ (circa il 10%), mentre $2/3 \times 2/3$ delle cellule non produrranno una catena H o una catena L.

Dopo ulteriori normalizzazioni statistiche sempre in relazione alle cellule B che producono una molecola Ig funzionale, risulterà che circa il 20% delle cellule B produrrebbe due Ig.

Nei calcoli dettagliati degli AA [2], questo livello di sintesi eterologa di 2 Ab diversi determinerebbe un livello di cellule B che esprimono sia anti-self che anti-nonself con una produzione complessiva di autoanticorpi a rischio di essere letale.

Occorre quindi ricalcolare gli effetti dell'esclusione aplotipica, nel senso di una efficienza aumentata, per ridurre la quota di B cellule produttive di un doppio anticorpo.

Una spiegazione può consistere nell'analisi del comportamento del gene D del solo locus della catena H e dalla presenza addizionale di nucleotidi alle giunzioni V – D e D – J.

Avendo stabilito che il limite del repertorio Ab è ragionevolmente non superiore a 10^7 , la variabilità D (D-diversity) è da reinterpretare perchè una libera e totale variabilità del frammento genico D comporterebbe un repertorio anticorpale finale di 10^{10} ed oltre.

Perchè proprio D dovrebbe avere scarsa diversità?

Finora le conseguenze dell'esclusione aplotipica è stata analizzata senza prendere in considerazione l'effetto del segmento D.

Un ulteriore evento di fusione genica abbasserebbe il livello di autoanticorpi di 2/3, se il segmento D, come i segmenti genici J – C, fosse funzionale solo in un segmento ORF (aperto alla lettura). Nel segmento D della catena H ci sono solo 1-5 codoni (pari alla produzione di 1-5 aminoacidi), pertanto è altamente improbabile l'inserzione di un codone di stop in 2 dei 3 schemi ORF.

Tuttavia la inserzione di un codone di terminazione è solo uno dei meccanismi per sintetizzare una proteina inattiva o non sintetizzarla affatto.

Se si attiva un meccanismo di inserzione di aminoacidi inadeguati (inappropriati per una giunzione D funzionante) in 2 ORF su 3, ovviamente non verrebbero prodotte o sarebbero non funzionanti i 2/3 delle catene H e questo migliorerebbe l'efficienza della esclusione aplotipica.

È ormai ben documentato che tutti e tre i tipi di ORF del segmento D possono essere inseriti tramite gli eventi di fusione genica, ma più del 90% delle Ig secrete utilizza solo uno degli ORF D [3]. Questo suggerisce che due dei 3 ORF relativi al segmento D non possono essere espressi in Ig secrete e la loro fusione con gli altri segmenti genici non conduce a sintesi di Ig.

Per massimizzare questo effetto di limitata espressione del segmento genico D (esclusione aplotipica D e conseguente diminuzione della variabilità del repertorio), bisogna teorizzare che gli eventi di fusione genica iniziano con la catena H (che contiene il segmento D) in modo che la sintesi delle Ig abbia affrontato questa seconda fase di esclusione aplotipica (cioè, il "D-disaster").

Da un punto di vista evolutivo, la esclusione aplotipica D costituisce il meccanismo più efficace di controllo della variabilità anticorpale: una cellula B equivale ad 1 sola catena H e gli errori sulla catena H si ripercuotono sull'intera produzione cellulare, avendo come effetto finale la riduzione di 2/3 della sintesi di IG funzionanti.

Più complicata e meno efficace una esclusione aplotipica sulla catena L se questa avesse un meccanismo di tipo "D", dato che c'è la possibilità di produrre 2 tipi di catena leggera e per ottenere lo stesso risultato di selezione come nella catena H dovremmo ipotizzare un doppio effetto di esclusione per la catena leggera k e per λ.

Questa linea di ragionamento, basata su considerazioni evolutive, fornisce un argomento molto più convincente dell'aforisma "*Perché proprio D dovrebbe avere scarsa diversità?*"

Infine, includiamo l'effetto dell'**N-addizione** ascrivibile all'aggiunta di nucleotidi extra non codificati (**N** sta per aggiunte di nucleotidi) nel sito delle 2 giunzioni V-D e D-J. Il numero di nucleotidi extra non codificati per giunzione varia da 0 a dieci, il che significa da 0 a 3 codoni diversi/giunzione ossia da 0 a tre aminoacidi per giunzione, e quindi da 0 a 6 aminoacidi per catena H (che dispone di 2 giunzioni, V-D e D-J).

Se accuratamente calcolato, si può ottenere che la esclusione aplotipica causata dagli errori V-D e D-J di una popolazione di B cellule sottoposta ad un carico antigenico giornaliero normale, non raggiunge quel limite ottimale della variabilità del repertorio che ci attendiamo, e che si colloca ad una concentrazione 2 o 3 volte inferiore.

Questa necessità di aumentare ulteriormente il grado di esclusione aplotipica ci induce ad approfondire il significato del fenomeno della corrispondenza della lunghezza di determinati segmenti proteici.

Esistono molti esempi di anticorpi che hanno la stessa specificità e sono codificati dalle stesse regioni V-L e V-H. In ciascun caso la lunghezza della regione N-D-N-J è la stessa (± 1 aminoacido), anche se alcuni nucleotidi nella regione possono variare in modo significativo [8].

Abbiamo interpretato le N-addizioni come un meccanismo di adeguamento della lunghezza e, quale risultato finale, la probabilità che una determinata catena H si accoppi funzionalmente con una catena L è compresa tra 1/3 e 1/10, in proporzione al numero di N-aggiunte e all'esatto punto di fusione genica in D e J.

In sintesi, tre eventi contribuiscono all'esclusione aplotipica:

1. Varianti della sequenza di lettura (mutazioni) formate nella giunzione V-J delle catene L e H
2. Varianti della struttura di lettura causate dalla inserzione di un tipo di segmento D nella catena H
3. Adeguamento della lunghezza della cat. H tramite N-addizioni che accompagnano l'inserimento del segmento D durante il meccanismo di fusione V-D-J.

Gli ultimi due eventi portano a una molecola di Ig non funzionale e non ad arresto della produzione.

In mancanza di una sufficiente conoscenza molecolare non si può definire con precisione il contributo statistico di ciascun fenomeno, ma è possibile argomentare che la loro combinazione conduca ad un unico parametro, denominato FIT dagli AA, e la migliore stima di FIT è vicina a 0,1.

FIT 0.1 significa che il 90% del repertorio teorico non viene espresso, ossia il 90% delle cellule B che esprimono Ig di superficie non sono funzionali.

Si tratta di una conclusione sorprendente che comunque scaturisce da un inevitabile ed imprescindibile meccanismo di esclusione aplotipica.

La funzione anticorpale dipende anche dalla conformazione della proteina

Le Ig secrete che legano l'antigene e di conseguenza attivano le altre funzioni come la fissazione del complemento e la fagocitosi, esprimono il segmento D derivato da una struttura di lettura selezionata (ovviamente quella efficiente).

La pressione selettiva che provoca l'effetto ORF di D, appena descritto, deve attuare l'induzione antigene specifica di questo effetto a livello di uno degli stadi di sviluppo, in particolare il "disastro D" agisce nello stadio in cui l'antigene stimola la differenziazione in plasmacellule.

E' comunemente accettato che il segnale antigenico induce l'attivazione della cellula B con un meccanismo di aggregazione recettoriale, nello stesso modo in cui le Ig segnalano l'inizio di reazioni effettrici (es. fissazione del complemento e fagocitosi) [7].

Sebbene vi sia un gran numero di esperimenti che dimostrano che l'aggregazione delle Ig di membrana (cioè del recettore B) attiva la cellula B, non vi è alcuna prova diretta che questo sia il modo in cui l'antigene induca segnali di attivazione per la cellula B.

Per inciso, se le Ig dovessero funzionare solo come un recettore la cui aggregazione induce segnale endocellulari, allora ci sarebbe poca o nessuna differenza di risultato nella attivazione di un sito di legame altamente specifico per l'antigene (*rispetto ad uno meno specifico - ndr*) come invece è stato accuratamente descritto dalla cristallografia a raggi X. Quindi, è logico postulare che la trasduzione del segnale nella cellula B avviene solo in seguito al cambio conformazionale indotto dal legame con l'Ag sulla Ig di membrana, e questo evento permette l'attivazione della cellula.

È nella trasduzione di questo segnale conformazionale che opera il fenomeno del "disastro D".

Omeostasi ed espansione clonale: un rapporto contraddittorio a rischio di fallimento

Risolvere il problema dell'esclusione aplotipica è il primo passo per valutare la funzionalità della risposta anticorpale.

La fase successiva riguarda l'induzione delle cellule B e il compromesso tra espansione clonale e omeostasi.

Assumendo che il repertorio delle specificità funzionali sia 10^6 e che il limite omeostatico delle cellule B sia di 10^7 /ml possiamo calcolare la reale possibilità di confronto ed ingaggio fra questo repertorio e l'universo antigenico. Se tutti i siti di legame, ovvero le

10^6 specificità, vengono ingaggiati da un antigene e soggetti ad espansione clonale allora ogni singola specificità subirà un incremento da 10 a 10^4 volte al fine di generare una concentrazione sufficientemente protettiva di anticorpi. Ne scaturisce che il parco delle cellule B dovrà crescere anche oltre 10^9 cellule/ml ovvero 100 volte di più rispetto al limite omeostatico di 10^7 cellule B totali /ml.

E' evidente che non tutte le cellule B possono essere simultaneamente sotto costante stimolazione antigenica. Nella realtà, anche se solo 10^4 specificità (**1% del repertorio**) viene ingaggiato dalla stimolazione antigenica, risulterebbe un aumento ai limiti della omeostasi (10^7 cellule B totali /ml) per espansione clonale e sempre ai fini di raggiungere un livello anticorpale protettivo.

In tale evenienza, il rimanente 99% del parco delle specificità verrebbe totalmente sostituito (effetto washout degli AA) a causa della espansione clonale dell'1% stimolato: **questo risultato è tragico ed inaccettabile.**

Riducendo il carico antigenico allo 0.1% del repertorio (ingaggio di 10^3 specificità) si lascerebbe uno spazio minimo alla selezione per mantenere un repertorio di 10^6 specificità diverse in toto : questo comporta una limitazione del reclutamento di 10^3 siti/specificità simultaneamente.

Supponendo la clearance del carico antigenico (che mantiene sottoppressione il repertorio) avvenga ogni 10 giorni (tempo medio per guarire da una infezione batterica senza farmaci), sarebbero necessari 10^4 giorni (ricavato da 10^3 gruppi [ciascuno con 10^3 specificità – in totale 10^6] ingaggiati x 10 gg = 10^4) per esplorare tutto il repertorio di 10^6 specificità con la cadenza suddetta di 10^3 specificità/24h.

10^4 giorni corrispondono a 30 anni, necessari in teoria per esaminare tutto il repertorio e trovare la specificità più efficiente per contrastare un determinato carico antigenico: un risultato francamente assurdo e non rispondente alla realtà.

Questo è solo un calcolo teorico, il cui significato reale è che di fronte ad un particolare carico antigenico (si pensi ad un carico “una tantum” cioè epidemico) i tempi potrebbero essere troppo lunghi.

A dire il vero, in passato, ci voleva qualche anno perchè alcune malattie fossero superate dalla popolazione, (per esempio se pensiamo alla peste), spesso con grande falcidia, ma non certo 30 anni, e a livello del singolo individuo queste malattie non duravano nemmeno un mese – ndr.

Questo significa che anche un repertorio di 10^6 specificità è troppo vasto di un fattore da 10 a 100 per essere realmente funzionale.

Il repertorio delle cellule B non può essere maggiore di 10^4 - 10^5 diverse specificità / ml.

In conclusione un repertorio di cellule B superiore a 10^{12} , descritto in letteratura, è davvero sovrastimato di un fattore superiore a 10^6 ?

Tramite i calcoli approssimativi di cui sopra si può ottenere un fattore di riduzione di 10^2 , ma i risultati sono controversi e contestabili e non risolvono completamente il problema perchè una correzione che sembra promettente da una parte, si rivela spesso errorea quando osservi i suoi effetti in altre situazioni.

Se si assume che è necessario, allo stato stazionario, un carico antigenico che saturi il 10% del repertorio totale per assicurare una adeguata pressione selettiva (tale pressione è utile a mantenere il S.I. “allenato” ad essere costantemente protettivo), otteniamo questi risultati.

In un repertorio medio di 5×10^4 specificità /ml (media tra 10^4 e 10^5), il 10% delle specificità impegnato dal carico antigenico corrisponde a 5×10^3 cellule che genera allo

stato stazionario, circa 5×10^6 plasmacellule/ml (che producono una concentrazione protettiva di anticorpi fra 1 e 100 ng/ml).

5×10^6 plasmacellule/ml sono il risultato di un amplificato di 10^3 volte (5×10^3 cellule B x 10^3 , v. sopra) – cifra entro il limite di 10^7 cellule B/ml, cioè il confine omeostatico prestabilito.

In queste condizioni di stato stazionario un campione di 10^7 cellule B conterrebbe 5×10^6 plasmacellule, che rappresentano il 10% del repertorio stimolato dal carico antigenico.

Il rimanente 90% del repertorio possibile (5×10^4 /ml - 5×10^3 /ml = 4.5×10^4 /ml) circa 4×10^4 /ml specificità andrebbe a saturare la restante ipotetica quota cellulare del repertorio (dopo l'amplificazione a 5×10^6 plasmacellule/ml generato da un carico antigenico costante del 10%) che è calcolabile in :

$$10^7 \text{ /ml} - 5 \times 10^6 \text{ plasmacellule/ml} = 5 \times 10^6 \text{ cellule B /ml}$$

Affinchè questa quota calcolata venga saturata occorre che 4×10^4 /ml specificità siano presenti ciascuna in 100 copie dato che:

$$4 \times 10^4 \text{ /ml} \times 10^2 \text{ /ml} = 4 \times 10^6 \text{ cellule B /ml}$$

entro il limite teorico di 5×10^6 cellule B /ml che, ripeto, è lo spazio libero lasciato dalla amplificazione stimolata da un carico antigenico del 10%.

Comunque **si deve tenere presente** che si tratta di semplificazioni aritmetiche, giusto per rendere il concetto, perchè la realtà è molto complessa.

Affinchè vi sia una protezione eguale per ogni millilitro di fluido corporeo occorre che il repertorio sia codificato nella linea germinale, cioè che al codice genetico venga applicato il calcolo combinatorio:

$$5 \times 10^4 \text{ segmenti genici diversi derivati dal prodotto } V_L \times V_H = \\ (2.2 \times 10^2 V_L) \times (2.2 \times 10^2 V_H)$$

ciò significa che i segmenti genici $2,2 \times 10^2 V_L$ e $2,2 \times 10^2 V_H$ generano un repertorio fisso 5×10^4 (prodotto della coppia $V_L \times V_H$).

Abbiamo dovuto includere il fattore FIT di 0,1 (fattore di adattamento al 10%), che considera il 90% delle cellule B non funzionali.

Se consideriamo, ad esempio, che il numero di cellule B funzionali in 1 ml è 10^6 , otteniamo che ciascuna delle 5×10^4 specificità sarebbe presente in un numero di copie di circa 20 [$10^6 / (5 \times 10^4) = 20$].

E' il doppio del limite di 10 cellule B / ml necessario per generare 100 ng /ml di anticorpi in 4-5 giorni .

Il problema consiste nel fatto che un repertorio prefissato, strettamente connesso alla potenzialità codificata nella linea germinale è anelastico, non credibile, nella economia naturale di un S.I. che deve contrastare l'enorme pressione dell'universo antigenico e della sua capacità mutazionale. Per comprendere come può essere accresciuta la potenzialità del repertorio delle specificità senza eccedere le condizioni limite imposte (scaturenti da considerazioni di economia naturale, anche se teoriche) dobbiamo introdurre il concetto di equivalenza nella funzione anticorpale.

Il concetto di equivalenza nella funzione anticorpale

Un repertorio di anticorpi costituito da 5×10^4 specificità sembra troppo piccolo se

consideriamo che gli alleli già noti di antigeni batterici e virali comuni da soli superano la quota 10^4 .

Dobbiamo ribadire 2 punti fondamentali.

1. Innanzitutto, non esiste un'identità perfetta 1:1 tra le specificità anticorpali e gli antigeni.
2. In secondo luogo, il repertorio funzionale di 5×10^4 /ml è stato stimato sulla base della necessità di produrre anticorpi funzionali /ml entro il confine omeostatico di 10^7 cellule B / ml.

Una concentrazione soglia di 10 ng / ml di anticorpi specifici contro un antigene potrebbe essere ottenuta con un anticorpo estremamente specifico "tipo monoclonale" a 10 ng / ml o dieci diversi monoclonali (tutti specifici per lo stesso antigene) ciascuno a concentrazione 1 ng / ml.

Il che significa che la soglia richiesta di 10 cellule B / ml potrebbe essere ottenuta con 10 cellule B identiche o 10 cellule B diverse.

Se accettiamo che vi siano 10 diverse cellule B ossia 10 diverse specificità anticorpali che interagiscono con 10 siti antigenici diversi (epitopi) dobbiamo ammettere che questi siano disponibili sull'antigene simultaneamente e siano in grado di legare anticorpi.

Non si può escludere che possano esistere antigeni più semplici, anche se nell'ambito della materia vivente ciò che chiamiamo patogeno sia composto, anche nelle forme più elementari da più di 10 Ag.

D'altronde è risaputo che se un antigene è monomero (catena polipeptidica ripetitiva semplice) devono essere riconosciuti e legati almeno 3 siti differenti affinché sia creata una aggregazione Ag – Ab efficiente.

Con una media di 10 siti riconosciuti per antigene monomero o frazione monomero di antigene più complesso, oltre il 99% degli antigeni sarà riconosciuto e reso aggregabile in almeno tre modi (10/3) differenti.

In conclusione l'**equivalenza** tra diversi campioni di 10^7 cellule B è raggiungibile teoricamente tramite due tipi di anticorpi:

1. un tipo comune e presente in un numero di copie elevato di cellule B (100 copie per 10^7 cellule B è vicino alla realtà secondo i calcoli degli AA).
2. L'altro tipo di anticorpo è prodotto da cellule B in singola copia per 10^7 cellule B totali.

Per generare i necessari 100 ng / ml di anticorpi specifici per inattivare un antigene, parte è prodotta da poche specifiche cellule B presenti in numero elevato di copie, e parte da molte e diverse cellule B presenti in basso numero di copie/singola copia; la concentrazione funzionale viene determinata dalla somma di anticorpi sintetizzati da queste 2 famiglie cellulari.

Per tentativi, abbiamo scoperto che il repertorio delle cellule B risulta ottimizzato rispetto al numero di specificità necessario e alla capacità di produrre 100 ng/ml di anticorpo in 4-5 giorni laddove 10^4 specificità sono inizialmente presenti nel gruppo delle cellule B ad alto numero di copie (100 x ogni specificità in teoria) e circa 5×10^4 presenti in singola copia/ per ogni specificità (totale aritmetico 6×10^4 diverse specificità).

- Le cellule B a copia singola rappresentano un campione di mutanti somatici derivato dalle cellule B codificate nella linea germinale in numero elevato di copie.
- La popolazione totale delle specificità mutanti altamente specifiche da cui viene selezionato il campione di 5×10^4 , dietro stimolo antigenico, è intorno a 10^6 e non può essere molto più grande.

Per esempio, un repertorio di mutanti di circa 10^8 (repertorio derivato dalle combinazioni create dal cambiamento di 2 coppie di basi) anche se selezionato secondo la regola $5 \times$

10^4 cellule B alla volta sarebbe troppo ampio per essere efficiente (*tanto per capirci per essere ispezionato in toto, alla ricerca della risposta più specifica all'antigene, dovrebbe essere esplorato 2×10^3 volte x 5 gg il che equivale a oltre 28 anni – ndr*).

Questi valori, per il repertorio germinale e per il repertorio dei mutanti, sono stati calcolati sulla base delle stime pubblicate di circa 100 segmenti genici di V_L e V_H funzionali nella linea germinale e del numero di specificità differenti per coppia $V_L - V_H$ che può derivare dal cambiamento di una singola base che, comunque, sia efficace a produrre la sostituzioni di un singolo aminoacido).

Secondo questi calcoli, il 10% dei 100 aminoacidi della regione V sono impegnati a determinare la specificità del sito di combinazione e ciò conduce al risultato che potrebbero esserci fino a 135 diverse specificità mutanti per coppia $V_L - V_H$.

Poiché ci sono circa 100 diversi segmenti genici V per le catene L e H [1], questo dà, per semplice calcolo combinatorio, 10^4 differenti / possibili coppie $V_L - V_H$ codificate nella linea germinale e, di conseguenza $1,3 \times 10^6$ differenti specificità per il cambio di una singola base (cambio di tipo somatico).

$$10^4 \times 135 = 1.35 \times 10^6$$

In sintesi, il repertorio ottimale di 5×10^4 diverse specificità viene generato in due fasi.

La fase I (stage I degli AA) è composta da 10^4 specificità codificate dalla linea germinale ciascuna presente in circa 100 copie.

Queste specificità costituiscono il substrato per il repertorio della fase II (stage II) di 4×10^4 mutanti in copia singola ad alta specificità che derivano dal pool teorico di $1,3 \times 10^6$ possibili mutanti teorici per cambio di singola base.

(spiegazione del valore 4×10^4 mutanti in copia singola:

$$5 \times 10^4 \text{ cellule totali} - 1 \times 10^4 \text{ cellule ad alto numero di copie} = 4 \times 10^4 - \text{ ndr}$$

Intuitivamente l'universo antigenico è enorme e nonostante ciò ogni antigene viene specificamente processato dal Sistema Immunitario.

In effetti il trattamento di ogni antigene in maniera specifica e peculiare per ciascuno di essi da parte del S.I. è reale, **ma questo non significa che la risposta immunitaria all'antigene è univoca, irripetibile per ciascun antigene.**

L'aforisma “per ogni antigene, un anticorpo specifico” è errato.

Il trattamento originale ed indipendente di ogni antigene non prescinde dalla probabilità che due antigeni a caso condividano tre o più epitopi.

L'alto livello di reazioni crociate rivelato dai saggi di laboratorio è una testimonianza di ciò che succede nella realtà naturale, ma non costituisce una prova della cross-reattività naturale, perché questi saggi misurano singoli epitopi condivisi mentre, per la cross-reattività naturale all'interno una tipica risposta immunitaria, sono necessari tre o più epitopi condivisi.

Per comprendere come il Sistema Immunitario possa utilizzare un repertorio limitato per competere con una massa quasi illimitata di antigeni, basta riflettere su quante diverse combinazioni si possono ottenere con 5×10^4 epitopi (definiti da 5×10^4 differenti siti di combinazione) combinati in pacchetti di 10 alla volta:

la risposta è stupefacente e consiste in $2,7 \times 10^{40}$ possibili pacchetti di combinazioni per contrastare altrettanti diversi siti antigenici.

La combinazione è la vera risposta specifica, “singola ed originale” verso un antigene.

Questa sembra essere la conclusione nascosta tra le righe di questo lavoro - ndr

Questo è quanto si può arguire in via teorica da un repertorio di cellule B modesto ed è un risultato soddisfacente e credibile.

Anche se vogliamo considerare una risposta immunitaria “bloccata” al limite inferiore del riconoscimento di 3 epitopi per antigene, le combinazioni ottenibili dal repertorio sarebbe:

$(5 \times 10^4)^3 = a$ oltre 10^{12} --- 10^{14} combinazioni anticorpali per epitopi diversi.

La strategia di possedere una miscela di anticorpi monoclonali ad alta concentrazione (100 B cell /ml) codificati dalla linea germinale ed un più ampio possibile settore di specificità differenti (4×10^4) a basse concentrazioni ottenute per mutazione somatica (mutanti a copia singola) rappresenta una soluzione notevolmente efficiente per contrastare un numero quasi illimitato di possibili antigeni pur conoscendone in partenza una limitata quantità, grazie ad un sistema di combinazioni biologiche delle variabilità, quasi illimitato.

Attraverso una serie di calcoli teorici, ma con una logica matematica sottesa, abbiamo stimato che una concentrazione di anticorpi protettiva debba essere raggiunta in 4-5 giorni.

Per paragone assurdo, consideriamo un elefante (grande massa fluida e imponente sistema linfonodale) capace di produrre un enorme numero di "B cell single copy", che abbia una singola cellula B specifica per un nuovo antigene virale o batterico; questa cellula B si deve dividere sufficientemente per proteggere i 10^7 ml di massa dell'elefante.

Raddoppiando ogni 12 ore, questa cellula B avrà generato una progenie di 10^{10} cellule in 15 giorni, quota cellulare necessaria a produrre la concentrazione di 10 ng / ml di anticorpi per l'intera massa dell'elefante.

Dal punto di vista dinamico potrebbe non essere sufficiente per salvare l'elefante dato che la capacità replicativa di un patogeno (virus compresi) può essere molto alta e provocare una setticemia mortale. Ad esempio un singolo batterio si divide ogni 6 ore e nei 15 gg calcolati avrebbe generato una progenie di 10^{18} ossia 10^{11} batteri / per ml di massa corporea dell'elefante!

Il Protecton

L'unità umorale di protezione immunologica

Ciascun campione di 10^7 cellule prese da un qualsiasi vertebrato (***su cui è calibrato questo lavoro, sia esso un topo, un essere umano o un elefante*** - ndr) ha sempre 5×10^4 diverse specificità e fra le diverse specie il pacchetto delle specificità immunitarie non è esattamente lo stesso, orientato per i tipi di antigene a contatto degli organismi e specializzato, in buona parte, in relazione alla nicchia ecologica occupata.

Inoltre, bisogna tenere in considerazione che gli animali di piccola taglia esistono in popolazioni più numerose con elevata prolificità rispetto agli animali più grandi e le conseguenze dell'eliminazione del 50% della popolazione (ad es. un topo) ogni anno sono meno catastrofiche rispetto ad una pari eliminazione di un animale di grossa taglia e bassa prolificità.

In questo senso, ha un suo significato biologico la probabilità che un eventuale deficit di repertorio per individuo (*rapportato alla taglia e alla evoluzione del S.I. della specie* - ndr) possa essere controbilanciato dal numero, in modo che la massa vivente possieda in toto una variabilità di repertorio ed un numero totale di cellule B molto simile fra le specie, per cui se potessimo calcolare le potenzialità di difesa, le troveremmo pressappoco simili fra le specie.

Queste considerazioni presuppongono l'introduzione della nozione di una unità di misura che contenga in sé tutte le capacità necessarie alla operatività ottimale del sistema (massima difesa, minimo sforzo), cioè, nel nostro caso, tutte le risorse basilari necessarie alla difesa del singolo individuo e principalmente della sua specie.

Se una unità contiene le specificità sufficienti per essere protettivo nel 90% dei casi, quando testato con un campione tipico del repertorio antigenico, il 10% mancante deve essere fornito da una maggiore capacità riproduttiva della specie - ndr.

Questa unità è il Protecton.

Stabilendo, per convenzione, il millilitro (*il che non vieta di adoperare altre unità volumetriche*) il Protecton è costituito da un totale di 10^7 diversità o specificità o cellule / ml (equivalente a 10^4 /mm³).

Un Protecton con meno di 10^7 diversità avrà meno di una copia di una cellula B specifica / ml e il teorema della equivalenza non potrebbe operare.

Attenzione, come accennato, non potrebbe operare per individuo, ma se la specie ha una dimensione numerica tale da concedere alla natura la perdita del 90% della popolazione (ad es. i girini) allora l'unità di base, il Protecton, potrebbe essere ridotto ad 1/10 dello standard richiesto per individuo, lasciando alla selezione il compito della sopravvivenza di quel 10% di individui con le specificità adatte in quel momento ed in quell'ambiente.

*A mio modesto parere le conclusioni di questo pregevole studio sembrano essere approssimative (mi allineo alle critiche espresse da alcuni ricercatori) soprattutto in confronto alle notevoli intuizioni che ne costituiscono la premessa e che la maggior parte degli scienziati avevano riconosciuto come geniali. Anche ammettendo le limitazioni che derivano dalle conoscenze dell'epoca, l'articolo è del 1992, un costrutto teorico deve avere una impalcatura che preveda gli sviluppi futuri dell'Immunologia. Resta salda, almeno per me, l'idea che vi sia una unità di base, una specie di mattoncino immunitario che permetta a qualsiasi essere vivente di rispondere alla offesa antigenica sia interna che esterna, salvo poi reclutare un apparato più complesso e sofisticato che tra l'altro fa ricorso alle reazioni crociate, come fenomeno naturale e non semplice osservazione di laboratorio. Comunque l'odierno stato dell'arte è rappresentato dal concetto di ridondanza, ossia dall'ipotesi che vi siano diversi percorsi immunitari (a seconda delle varie specie, comprese le piante) per ottenere lo stesso effetto di protezione. **Queste idee sono descritte in un articolo di revisione di Pradeau – Du Pasquier, 2018. - ndr.***

Un Protecton più ampio di 10^7 B cellule potrebbe comportare la presenza casuale di mutanti rari (cioè quelli con il cambiamento di 2 basi) che non possono essere presenti a frequenze superiori a 10^{-8} (per evitare l'eccesso di mutanti autoimmuni letali).

Inoltre il superamento di 10^7 B cellule richiederebbe una massa fluida totale in un range minimo di 1 – 10 lt affinché la sommatoria di unità protettive (il Protecton) per equivalenza possa essere operante (avere la stessa velocità di azione in termini di esplorazione/tempo di guarigione).

Questo negherebbe un sistema immunitario funzionale esistente in qualsiasi animale con massa inferiore ad un cane.

Definizione conclusiva

Il Protecton, unità di protezione immunitaria, è naturalmente contenuta in un campione di 10^7 cellule B e la sua funzione è determinata da diverse condizioni limite (assunti):

1. avere almeno il 10% del repertorio sotto pressione antigenica (ovvero reclutamento costante del 10% delle cellule B per stimolo Ag)
2. attivazione dell'esclusione aptotica in misura sufficiente a garantire un basso, nei limiti fisiologici, livello di cellule con doppia specificità (spesso di tipo antiself + anti-nonselself) che potrebbero provocare autoimmunità letale
3. generazione di una protezione anticorpale efficace di 100 ng /ml, mediamente in 4-5 giorni.

CONCLUSIONI

In questo breve saggio gli AA reputano di avere appena scalfito la superficie di un affascinante processo evolutivo che ha messo a confronto il mondo in rapida evoluzione dei batteri, virus, funghi ed altri esseri viventi che possano essere causa di malattia in contrapposizione all'evoluzione somatica del sistema immunitario umorale di altri esseri viventi.

I principi della funzione anticorpale, come illustrati ed ipotizzati, sembrano essere abbastanza credibili, sia dal punto di vista della dinamica dell'azione che delle osservazioni scientifiche di biologia molecolare.

Riferimenti Bibliografici

1. Brodeur P, Riblet RJ, The immunoglobulin heavy chain variable region in the mouse. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. Eur J Immunol 14:922, 1984 [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
2. Cohn M, Langman RE, The Protecton: the evolutionarily selected unit of humoral immunity. Immunol Rev 115:7, 1990 [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
3. Coleclough C, D-J joining and D-J proteins in B cells and T cells. Immunol Today 6:128, 1985 [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
4. Davis MM, Bjorkman PJ, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 334:395, 1988 [PubMed](#) [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
5. Huber R, Structural basis for antigen-antibody recognition. Science 233:702, 1986 [PubMed](#) [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
6. Langman RE, The immune system. Academic Press, San Diego, 1989 [Google Scholar](#)
7. Monroe JG, Cambier JC, B cell activation. I. Anti-immunoglobulin induced receptor cross-linking results in a decrease in the plasma membrane potential of murine B lymphocytes. J Exp Med 157:2073, 1983 [PubMed](#) [CrossRef](#) [Google Scholar](#)
8. Rudikoff S, Immunoglobulin structure-function correlates: antigen binding and idiotypes. Contemp Top Mol Immunol 9:169, 1983 [PubMed](#) [Google Scholar](#)
9. Tonegawa S, Somatic generation of antibody diversity. Nature 302:575, 1983 [PubMed](#) [CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Una critica alla teoria del Protecton di Cohn-Langman

Immunological Reviews – Volume 115, Issue 1 - 1990

Christopher COLECLOUGH

Department of Immunology. St. Jude Children's Research Hospital. Memphis. Tennessee 38101. U.S.A.

Cohn e Langman definiscono il loro Protecton come "il più piccolo campione di cellule B e di anticorpi umorali che mantengono tutte le proprietà funzionali del sistema immunitario". Le basi teoriche su cui si fonda l'esistenza di tale unità sono state pubblicate sinteticamente in un loro precedente articolo e deriva da tre postulati che ritengono veri, (Langman & Cohn 1987):

1. Vi è una quantità minima di Ig specifica per un antigene che è richiesta per la funzione effettrice umorale
2. Questa concentrazione di Ig è prodotta da 10 cellule B indotte alla divisione per 6 cicli e che quindi producono ...più di 500 plasmacellule
3. Tutte le specie hanno un valore medio allo stato stazionario di circa 10^7 cellule B totali/ml di liquido corporeo.

Sono assolutamente d'accordo con tutto questo e, anche se non sono d'accordo con molte delle conclusioni che traggono da queste premesse, **penso che abbiano evidenziato un attributo del sistema immunitario così basilare che io lo considero non tanto una teoria quanto una comprensione reale dell'attività immunitaria.**

In effetti, l'intuizione di Cohn e Langman è così essenziale che, ora che lo hanno sottolineato, molti immunologi senza dubbio lo considereranno più che evidente.

Una disamina completa del loro modello richiederebbe un documento abbastanza lungo, che nessuno gradirebbe, fra i lettori di queste problematiche. Pertanto, affronterò alcuni aspetti del loro modello su cui non sono d'accordo. Anche se la mia valutazione può sembrare negativa – in realtà queste critiche dovrebbero essere viste positive, nell'apprezzare le intuizioni basilari e l'originale lavoro di elaborazione compiuto.

Prima di entrare nello specifico, voglio commentare lo stile generale del paper di Cohn / Langman: mi sembra curiosamente medievale. Questo sapore scolastico nasce dalla combinazione di problematiche circoscritte e troppo criticismo, di cui l'intero documento consiste: in nessuna parte (nonostante il titolo della Parte quattro, Sezione II) si suggeriscono esperimenti che potrebbero essere fatti per testare i componenti del loro modello.

Vi è un uso ripetuto di imperativi – es. nella sezione sul rapporto k/λ , noi leggiamo che "... se si trova che il rapporto k/λ è > 1 , allora deve essersi verificata una selezione antigenica" e "...data la necessità di un rapporto antigene-indipendente C_k-C_λ , di circa 1.." - è il risultato di un linguaggio eccessivamente zelante, e non di un freddo ragionamento.

L'euristica* della teoria biologica: il caso della discriminazione self - nonself

Sol Efroni^{a,b} and Irun R. Cohen^a

- a) The Department of Immunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel
- b) The Department of Computer Science and Applied Mathematics, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

Received 6 June 2003; accepted 6 June 2003 - *Cellular Immunology* 223 (2003) 87–89

Sunto

Melvin Cohn ha risposto alla nostra critica del modello minimale di discriminazione self - nonself proposto insieme a Langman.

In questa controrisposta a Mel Cohn, riassumiamo le differenze essenziali tra il nostro punto di vista ed evidenziamo un criterio (fra molti) per preferire una teoria rispetto ad un'altra nel complesso campo della biologia: preferire una teoria, piuttosto che tentare di risolvere un problema, è un atteggiamento euristico.

Una solida teoria è quella che stimola uno scienziato ad eseguire esperimenti nuovi e produttivi di conferma o smentita.

***Euristica : metodologia di approccio alla soluzione dei problemi che non segue un chiaro percorso, ma che si affida all'intuito e allo stato temporaneo delle circostanze, al fine di generare nuova conoscenza.**

1 – Punti critici essenziali

Melvin Cohn ha affermato [1] :

Se si vuole discutere sul fatto che il sistema immunitario non è un meccanismo protettivo e biodistruttivo (eliminazione di Ag - TBR) ma svolge il suo ruolo principale come sistema di regolazione per una varietà di normali funzioni fisiologiche [2], ovviamente non è richiesta una discriminazione NTBR (Not-To-Be-Ridged) - TBR (To-Be-Ridged): è irrilevante.

Questa affermazione è il nocciolo della differenza con il nostro punto di vista opposto [3].

Langman e Cohn si concentrano sulla discriminazione "biodistruttiva" che viene operata da un sistema immunitario essenzialmente "protettivo" [4]. Noi, al contrario, vediamo il sistema immunitario come il "sistema regolatorio" responsabile della "funzione fisiologica" chiamata "infiammazione" [5]. Tutte le argomentazioni conseguenti scaturiscono da questa differenza fondamentale di opinione.

Prima di procedere, mettiamo in evidenza che Langman e Cohn non sono soli:

per almeno mezzo secolo, l'immunologia tradizionale ha insegnato che il ruolo principale del sistema immunitario è quello di proteggere un organismo ed eliminare il nonself.

E così la discriminazione tra self e antigene estraneo deriva da una concezione comune in immunologia [6].

Il modello minimale, che si basa sulla capacità dei recettori di adattarsi all'antigene per distinguere il self dal nonself, è un'espressione logica di questa rappresentazione ideale.

Allo stesso modo, noi rappresentiamo una corrente ideologica robusta:

i padri fondatori dell'immunologia, precedenti all'era della discriminazione self - nonself, si sono concentrati sulle varie espressioni dell'infiammazione come confine fra uno stato di salute e di malattia [7]. La nostra preferenza per la complessità esplicativa dell'infiammazione rispetto alla semplicità della discriminazione self - nonself si può dire che segna un ritorno dell'immunologia alle sue radici storiche [7].

La specificità del sistema immunitario non è in ciò che riconosce, ma nel modo in cui

risponde.

In un'area intermedia, posizionata tra Langman/Cohn e noi, si colloca Silverstein: la discriminazione self - nonself non è che un corollario della classica teoria della selezione clonale (CST), e quindi può essere abbandonata senza mettere in pericolo l'essenza della CST [8].

Parnes sostiene un'altra ipotesi: la specificità del recettore e la discriminazione self - nonself sono ugualmente fondamentali per la CST [9]; non si può abbandonare la discriminazione self - nonself operata dai recettori dell'antigene senza far crollare l'ortodossia della CST.

Comunque questo problema va oltre la nostra discussione attuale.

2 - La conoscenza

Melvin Cohn ha affermato [1] :

Quando dico che ho capito un sistema biologico, intendo che, finalmente, posso inserirlo in un contesto evolutivo che definisce il percorso selettivo che ha portato alla sua comparsa.

Questa affermazione segna l'obiettivo della teoria e anche qui siamo d'accordo con Cohn: lo scopo della teoria è la conoscenza; una buona teoria scientifica ci aiuta a capire come funziona la natura.

Ma non siamo d'accordo con Cohn quando scrive che il percorso selettivo del "contesto evolutivo" costituisce la conoscenza. L'evoluzione è certamente una delle più grandi idee, forse la più grande, in biologia.

Siccome "la sopravvivenza del più adatto" è un concetto che non è possibile falsificare o modificare, alcuni hanno messo in dubbio che la teoria dell'evoluzione possa essere considerata una vera e propria teoria scientifica [10] (In effetti, alcuni si sono chiesti se un semplice modello a due segnali di riconoscimento della risposta immunitaria sia esso stesso falsificabile; [11]).

Indipendentemente dall'importanza di tali affermazioni, noi non pensiamo che potremo mai confutare il modello evolucionistico ipotizzato da un'altro ricercatore semplicemente affermando la supremazia del nostro modello evolucionistico; ciascuno ha diritto di affermare le proprie convinzioni.

In realtà, il modello evolucionistico è il problema contestato: si preferisce un modello evolucionistico del self – non self o la teoria dell'infiammazione?

Comprendere il modello evolucionistico è quindi una questione soggettiva e non è una questione che vale la pena di affrontare. Quello che cerchiamo è un criterio oggettivo per decidere se la semplice discriminazione self - nonself o un complesso sistema della infiammazione è la teoria più adatta, al momento, per un reale progresso dell'immunologia.

3 - Euristica

L'idoneità di una teoria scientifica non può essere giudicata dalla sua popolarità a lungo termine; le teorie scientifiche, specialmente in campi complessi come la biologia, sono destinate a essere dinamicamente superate e sostituite da nuove teorie [12]. La biologia, come l'evoluzione stessa, si rinnova sempre.

Cohn sottolinea che una buona teoria dovrebbe fornire una "soluzione euristica" [1]. Ora la parola euristica significa "metodologia di approccio alla soluzione dei problemi che non segue un chiaro percorso, ma che si affida all'intuito e allo stato temporaneo delle circostanze, al fine di generare nuova conoscenza. ".

Quindi, una buona teoria biologica è una teoria che serve al processo della conoscenza; una teoria accettata da un ricercatore lo motiva ad intraprendere esperimenti che

confermano o smentiscono il sistema in studio.

La preferenza per una teoria è un fatto euristico (*fiducia verso una intuizione - ndr*) - un stimolo alla nuova ricerca.

Si noti che una teoria euristica non limita il campo della ricerca alla risoluzione dei problemi.

Al contrario, una buona teoria euristica crea problemi; una buona teoria euristica apre la strada a ricerche altrimenti impensabili.

Vorremmo dire che l'uso di Cohn del termine "soluzione euristica" è contraddittorio; le domande sono il fulcro dell'euristica, non le soluzioni.

Possiamo ora riformulare la disputa tra la semplicità del concetto self - nonself e la complessità della teoria dell'infiammazione: quale è stata nel passato la letteratura euristica sulle tante diverse tesi e quale di queste è probabile che sia vincente nel prossimo futuro?

4 – la letteratura self - nonself

La precedente letteratura sulla discriminazione self - nonself (che vorremmo equiparare alla CST) è stata molto ampia.

Si potrebbe sostenere che il concetto della discriminazione self - nonself ha guidato la ricerca che ha prodotto grandi scoperte come la struttura molecolare dell'anticorpo, il recettore delle cellule B e il recettore delle cellule T ed ha chiarito la biologia molecolare della ricombinazione somatica del recettore dell'antigene.

Il concetto di specificità del recettore self - nonself è di natura euristica; sembra che i recettori dell'antigene operino con un immenso grado di degenerazione molecolare [13-15]. Ad esempio un singolo recettore delle cellule T può riconoscere forse milioni di diversi ligandi peptidici.

La discriminazione self - nonself semplicemente non è ottenibile da un recettore delle cellule T su scala molecolare.

Si potrebbe sostenere che il concetto di discriminazione self - nonself non è stato utile nel campo delle malattie autoimmuni.

Secondo la CST (teoria della selezione clonale), ha affermato Burnet, due persone non potrebbero mai soffrire della stessa malattia autoimmune; non ci si aspetterebbe mai che due persone ospitino lo stesso clone proibito [16].

In tal modo, la CST ha sconvolto l'ordine nosologico inerente alle principali malattie autoimmuni cliniche [17] e in un certo senso ha negato l'esistenza stessa dell'autoimmunità fisiologica [18].

Inoltre, la teoria della discriminazione self - nonself, collegata alla CST, ha favorito terapie della malattie autoimmuni volte a bloccare il riconoscimento self o progettate per distruggere i linfociti auto-reattivi [19].

Purtroppo questa strategia terapeutica ha finora fallito. Peggio ancora, la teoria del self - nonself ha scoraggiato approcci alternativi che potevano comportare il trattamento di malattie autoimmuni attivandone un qualche tipo di regolazione. Come affermano Langman e Cohn, non è necessario alcun tipo di regolazione immunitaria periferica; il solo modello minimale risolve il problema della regolazione [4].

Cohn invoca il gene AIRE come esempio di selezione negativa nel timo che se non funziona può far sviluppare malattie autoimmuni [1].

(AIRE (Autoimmune Regulator) è un gene che codifica per una proteina che funziona come fattore trascrizionale e promuove nel timo l'espressione di componenti di cellule che formano tessuti e organi esterni al timo. Questo implica che la presenza nel timo di tali componenti favorisca i normali processi di delezione infratimica che regolano la tolleranza centrale. In assenza di AIRE i linfociti T sfuggono alla selezione negativa, entrano in circolo e, in periferia, attaccano i

tessuti che esprimono tali antigeni.)

Questa interpretazione, tuttavia, è solo una delle tante possibili alternative che potrebbero essere correlate alle molteplici azioni di un gene molto complesso [20]; forse l'AIRE potrebbe influenzare la selezione positiva del network immunitario (silenziando i fenomeni autoimmuni, gli AA non lo chiariscono – è una ipotesi buttata lì senza alcuna conferma scientifica, ndr)?

5 – La letteratura sull'autoimmunità fisiologica

L'autoimmunità fisiologica è un'idea complessa che nasce dall'idea che il sistema immunitario regola l'infiammazione - ciò che Cohn chiama una "varietà di normali funzioni fisiologiche" [1].

Il concetto di autoimmunità fisiologica non è solo teoria; serve a guidare programmi di ricerca in fisiologia e fisiopatologia immunitaria. Le vaccinazioni con le cellule T [21] e le vaccinazioni auto-peptidiche [22] per le malattie autoimmuni sono attualmente nelle sperimentazioni cliniche di fase II.

Queste strategie terapeutiche sono nate dall'idea complessa che il sistema immunitario sano riconosce il self con un meccanismo ordinato e regolato.

Il ruolo dimostrato dell'autoimmunità nella protezione del sistema neurologico è un altro risultato euristico di un tipo di ricognizione fisiologica del self [23].

La fisiologia del riconoscimento self è fondamentale per la ricerca attuale sulle funzioni delle cellule T CD25 positive [24,25], ed è un cardine teorico alla base della terapia di tolleranza orale per le malattie autoimmuni [26].

La ricerca su un network immunitario di linfociti che riconosce il self continua ad essere produttiva in senso euristico [27,28].

L'interazione di molecole "self" con recettori immunitari innati e recettori dell'immunità acquisita è un'altra prodotto euristico della fisiologia del riconoscimento self [29].

Noi crediamo che la discriminazione self – nonself, abbia fatto il suo tempo, fino all'esaurimento della sua funzione scientifica.

Il futuro è una fisiologia che fonda insieme le intuizioni scientificamente più valide per creare un sistema funzionante.

Questo dibattito euristico è lasciato al giudizio del lettore.

Riferimenti bibliografici

- 1) M. Cohn, Does complexity belie a simple decision—on the Efroni and Cohen critique of the Minimal Model for a self–nonself discrimination, *Cell. Immunol.* 221, 138–142.
- 2) I.R. Cohen, *Tending Adams Garden: Evolving the Cognitive Immune Self*, Academic Press, London, 2000.
- 3) S. Efroni, I.R. Cohen, Simplicity belies a complex system: a response to the minimal model of immunity of Langman and Cohn, *Cell. Immunol.* 216 (2002) 23–30.
- 4) R.E. Langman, M. Cohn, If the immune repertoire evolved to be large, random, and somatically generated, then..., *Cell. Immunol.* 216 (2002) 15–22.
- 5) I.R. Cohen, Discrimination and dialogue in the immune system, *Semin. Immunol.* 12 (2000) 215–219 (discussion 257–344).
- 6) J. Klein, *Immunology: The Science of Self–Nonself Discrimination*, Wiley, New York, 1982.
- 7) O. Parnes, “Trouble from within”: allergy, autoimmunity and pathology in the first half of the twentieth century, *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* (in press).
- 8) A.M. Silverstein, The clonal selection theory: What it really is and why modern challenges are misplaced, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 793–796.
- 9) O.S. Parnes, The specificity of the clonal selection theory, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 95.
- 10) K.R. Popper, P.A. Schilpp, *The Philosophy of Karl Popper*, Open Court, La Salle, IL, 1974.
- 11) R.N. Germain, The art of the probable: system control in the adaptive immune system, *Science* 293 (2001) 240–245.
- 12) S. Kuhn, *The Structure of Scientific Revolutions*, University of Chicago Press, Chicago, 1970.
- 13) E. Borrás, R. Martín, V. Judkowski, J. Shukaliak, Y. Zhao, V. Rubio-Godoy, D. Valmori, D. Wilson, R. Simon, R. Houghten, C. Pinilla, Findings on T cell specificity revealed by synthetic combinatorial libraries, *J. Immunol. Methods* 267 (2002) 79–97.
- 14) M. Jacobsen, S. Cepok, W.H. Oertel, N. Sommer, B. Hemmer, New approaches to dissect degeneracy and specificity in T cell antigen recognition, *J. Mol. Med.* 79 (2001) 358–367.
- 15) E. Maverakis, P. van den Elzen, E.E. Sercarz, Self-reactive T cells and degeneracy of T cell recognition: evolving concepts—from sequence homology to shape mimicry and TCR flexibility, *J. Autoimmun.* 16 (2001) 201–209.
- 16) F.M. Burnet, *Self and Not-Self*, Cambridge University Press, Cambridge, 1969.
- 17) I.R. Cohen, The cognitive principle challenges clonal selection, *Immunol. Today* 13 (1992) 441–444.
- 18) I.R. Cohen, The cognitive paradigm and the immunological homunculus, *Immunol. Today* 13 (1992) 490–494.
- 19) J.F. Bach, Immunosuppressive therapy of autoimmune diseases, *Immunol. Today* 14 (1993) 322–326.
- 20) J. Pitkanen, P. Peterson, Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity, *Genes Immun.* 4 (2003) 12–21.
- 21) V. Kumar, E. Sercarz, J. Zhang, I. Cohen, T-cell vaccination: from basics to the clinic, *Trends Immunol.* 22 (2001) 539–540.
- 22) I. Raz, D. Elias, A. Avron, M. Tamir, M. Metzger, I.R. Cohen, Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial, *Lancet* 358 (2001)

1749–1753.

- 23)[23] M. Schwartz, I.R. Cohen, Autoimmunity can benefit self-maintenance, *Immunol. Today* 21 (2000) 265–268.
- 24)[24] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, T. Takahashi, Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance, *Immunol. Rev.* 182 (2001) 18–32.
- 25)[25] E.M. Shevach, CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 389–400.
- 26)[26] Y. Komagata, H.L. Weiner, Oral tolerance, *Rev. Immunogenet.* 2 (2000) 61–73.
- 27)[27] V. Kumar, E. Sercarz, An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes, *Immunol. Rev.* 182 (2001) 113–121.
- 28)[28] H. Jiang, N.S. Braunstein, B. Yu, R. Winchester, L. Chess, CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6301–6306.
- 29)[29] C. Habich, K. Baumgart, H. Kolb, V. Burkart, The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins, *J. Immunol.* 168 (2002) 569–576.