

**APPUNTI DI IMMUNOLOGIA**  
**Una breve viaggio fra storia, teorie ed evidenze scientifiche**  
**I sezione**

**a cura di A. Martella**

nei capitoli 1 e 2 sono riportati ampi stralci e sintesi delle segg. opere:

**Immunobiologia – 5<sup>^</sup> edizione**

AA.: Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Bhlomchik

**Immunobiologia di Janeway – 8<sup>^</sup> edizione**

AA.: Kenneth Murphy

**Il sistema immunitario: La bilancia della vita - II edizione 2008**

AA.: Francesco Bottaccioli

**1 - PROLOGO**

E' universalmente acquisito che il sistema immunitario sia il terzo grande **network** di regolazione generale dell'organismo, insieme a quello nervoso e a quello endocrino, specializzato nell'organizzazione delle difese sia interne che esterne.

Vi sono 2 concetti da ribadire:

1. la complessita del Sistema Immunitario è pari a quella del S. Nervoso
2. procede con gli stessi meccanismi dell'altro, ossia
  - a) indaga su tutto ciò che lo circonda (mondo esterno ed interno)
  - b) memorizza le sue elaborazioni
  - c) risponde agli stimoli (infezioni o alterazioni cellulari)

Ovviamente i 2 sistemi differiscono nei meccanismi messi in atto per assolvere le funzioni summenzionate.

1. Il sistema nervoso ha una locazione fisica precisa nel cervello per elaborazione, memoria, e risposta agli stimoli ed una serie di sensori esterni ad esso collegati. **Le sue cellule sono perenni**
2. Il sistema immune consiste in una serie di popolazioni cellulari in perenne contatto fra di loro e con le altre cellule dell'organismo per lo scambio delle informazioni.
3. I linfociti sono cento volte più numerosi dei neuroni e, diversamente da questi, sono anche liberi di muoversi, qualità fondamentale per capire la diversa evoluzione dei due sistemi.
4. Le cellule del sistema immune reagiscono sia mediante incontri diretti che attraverso molecole che possono essere citochine, chemochine, ormoni, anticorpi e neurotrasmettitori. Possono riconoscere ed essere riconosciute formando così un network.

Quindi le molecole di comunicazione non sono solo un prodotto cellulare per l'attività interna, ma sono anche in grado di stabilire una comunicazione con gli altri network.

Viceversa le molecole prodotte dal sistema nervoso ed endocrino svolgono importanti funzioni di comunicazione (stimolatoria o inibitoria) sulle cellule immunitarie.

Un ruolo fondamentale assume una grande famiglia di sostanze proteiche, le citochine, sia nel determinare il tipo di reazione immunitaria sia nel fungere da messaggeri della comunicazione tra i tre grandi sistemi (immunitario, endocrino e nervoso). Esse vengono prodotte, oltre che dalle cellule immunitarie, dalle cellule cerebrali (cellule gliali) e da molte altre cellule (l'interleuchina-1, IL-1, ha un ruolo fondamentale nel dialogo tra sistema immunitario, cervello e ghiandole endocrine).

La produzione di peptidi ormonali, al pari della produzione delle citochine serve a modulare la risposta immunitaria (ad esempio, così come l'ACTH, ormone adrenocorticotropo ipofisario, stimola la produzione di cortisolo da parte delle ghiandole surrenali, l'ACTH linfocitario serve a bloccare la produzione di anticorpi ed ha un ruolo centrale nella comunicazione tra i grandi sistemi.

Pertanto, le cellule immunitarie, oltre che all'antigene, reagiscono agli stimoli che provengono dal

cervello e dal sistema endocrino. Alla luce delle conoscenze attuali, si può affermare che la risposta immunitaria all'antigene è fortemente condizionata dal sistema neuroendocrino. Il linfocita, infatti, presenta recettori per i più importanti neurotrasmettitori (adrenalina, noradrenalina e acetilcolina). In conclusione, oggi, possiamo affermare che la distinzione tra neurotrasmettitori, neuropeptidi e ormoni è in gran parte artificiosa.

La tabella che segue riassume solo alcune delle relazioni conosciute tra neuropeptidi e immunità con particolare riferimento alla cute. Inoltre, studi decennali del gruppo di David Felten, direttore del Centro di Neuroimmunologia della Scuola di Medicina della californiana Loma Linda University, hanno ampiamente documentato l'estesa innervazione degli organi linfoidi da parte di fibre neurovegetative rilascianti soprattutto noradrenalina, acetilcolina e neuropeptidi.

Infine, nei primi anni di questo secolo è stata identificata una nuova fondamentale relazione tra sistema nervoso ( sistema neurovegetativo) e cellule immunitarie.

Molto studiato il ruolo del nervo vago che, da solo, rappresenta il 75% di tutte le fibre nervose parasimpatiche.

**Tabella neuropeptidi ed immunità cutanea**

<b>Neuropeptidi</b>	<b>Fonti e recettori</b>	<b>Azioni</b>
<b>Acetilcolina</b>	Nervi colinergici, cheratinociti, linfociti, melanociti	Media il prurito nella dermatite atopica; regola la proliferazione dei cheratinociti. Induce il rilascio di citochine infiammatorie
<b>CGRP e Adrenomedullina (ADM)</b>	Rilasciate da fibre sensoriali. Recettori nei cheratinociti	Trasmissione del dolore. Vasodilatazione arteriole, edema dalle venule. Accumulo neutrofili e stimolo TNF
<b>Catecolamine</b>	Rilasciate da nervi, da cheratinociti e melanociti. Recettori in NK, monociti, cell. dendritiche, linfociti T	Sopprimono TH1 (se $\beta$ 2-AR)
<b>CRH</b>	Nervi, cheratinociti, mast-cellule	Rilascia istamina, citochine, TNF da mast-cellule CRH-R1 aumenta in orticaria. Stimola fibroblasti. Regola pigmentazione
<b>Endocannabinoidi</b>	Rilasciati da nervi, da linfociti T, da macrofagi. Recettori su nervi, mastoidi, macrofagi, cheratinociti	Azione antipruriginosa e antinocicettiva. Inibiscono citochine e sottoregolano rilascio IL-1, TNF. Sopprimono TH1
<b>Chinine (neurochinina-A; bradichinine; emochinina-1; sostanza P)</b>	Fibre nervose sensoriali, cellule endoteliali della microvascolatura dermica; cheratinociti; linfociti B	Bradichinine: dolore e prurito, vasodilatazione, ipotensione. Sostanza P: trasmissione nocicettiva; azione infiammatoria su mastoidi

<b>NGF e BDNF</b>	Cheratinociti, mastoidi, fibroblasti, eosinofili	NGF aumenta in dermatite atopica è sottoregolato in infiammazione. Attivatore mastoidi, stimola proliferazione linf. B. BDNF incrementa chemiotassi eosinofili
<b>Derivati POMC (endorfine, MSH, ACTH)</b>	Melanociti, cheratinociti, monociti, mastociti	Controllo dolore e infiammazione
<b>Neuropeptide Y</b>	Nervi sensoriali, cheratinociti	Regolazione del flusso sanguigno. Riflesso vasocostrittorio
<b>Istamina</b>	Fibre nervose sensoriali. Cellule endoteliali, linfociti T	Induce vasodilatazione e stravasamento di plasma. Induce prurito stimolando specifiche fibre sensoriali.
<b>VIP</b>	Fibre sensoriali e vegetative, cellule T, macrofagi, cheratinociti, endotelio microvascolare	Azione antinfiammatoria. Da Th1 a Th2. Sottoregola IL-10 dalle c. dendritiche
<b>Somatostatina</b>	Fibre nervose sensoriali Numerose cellule in gran parte dei tessuti. La cortistatina, simile alla somatostatina, prodotta dalle cellule immunitarie	Azione inibitoria dell'attività immunitaria antiproliferativa, antinfiammatoria

Molte sono le domande e gli argomenti da sviluppare nel confrontare il sistema immunitario con il sistema nervoso.

Nonostante le somiglianze nelle funzioni e nella complessità dei meccanismi biochimici messi in atto, una grande ed evidente differenza la troviamo nel diverso sviluppo evolutivo che i due sistemi hanno subito all'interno della stessa classe dei mammiferi.

E' innegabile che il sistema nervoso dell'uomo ha subito un'evoluzione assolutamente imparagonabile rispetto a tutti gli altri mammiferi, mentre il sistema immunitario mantiene numerose analogie fra l'essere umano e le altre specie, in molte delle sue funzioni.

Darsi una risposta non è semplice, ma possiamo formulare semplici ipotesi:

- a) il sistema immunitario è enormemente dinamico rispetto al sistema nervoso. I contatti cellulari e biochimici con il mondo interno ed esterno sono estremamente "fluidi" nel senso che numerosi sono i tipi cellulari che con una gerarchia prestabilita molto elastica possono assumere informazioni o essere attivati da molecole "trasmettenti" appartenenti al proprio sistema o agli altri 2 (endocrino e nervoso). Il fine ultimo del sistema immunitario è analogo per tutti gli esseri viventi, cioè preservare l'integrità dell'organismo da insulti interni/esterni.
- b) al contrario nel sistema nervoso c'è una dipendenza gerarchica più rigida fra l'apparato di elaborazione (il cervello) e i sistemi di correlazione con il mondo esterno e all'interno di questi vi è sempre una parte dell'apparato sensoriale o di quello motorio più sviluppata, nel

corso della evoluzione, fra coloro che appartengono ad una classe o ad una specie etc....

In sintesi, senza voler eccedere in ipotesi poco supportate da dati scientifici e limitando questo discorso a noi stessi, l'essere umano non ha un apparato olfattivo paragonabile a quello degli altri mammiferi, ha escluso due arti dalla corsa, pertanto è meno veloce e non li ha adattati al volo; in alternativa ha il pollice opponente sviluppando una sensibilità prensile e di manipolazione unica. La mano, infatti, è fortemente rappresentata nel cervello.

Ha inoltre sviluppato i sensori alla luce, gli occhi, con una forte discriminazione dei colori, ed un'ottima stereoscopia, come gli appartenenti ad un'altra classe, quella degli uccelli.

In conclusione la distanza evolutiva del nostro sistema nervoso, rispetto a quello degli altri esseri viventi è enorme, cosa che non verifichiamo nel sistema immunitario.

## **2 - LA RIVOLUZIONE COPERNICANA NEL SISTEMA IMMUNITARIO**

Ad una semplice analisi storica appare evidente che l'immunologia è progredita con grande rapidità, negli ultimi quaranta anni.

Inoltre, dall'inizio del XXI secolo, i principali risultati dei progressi dell'immunologia riguardano direttamente la pratica clinica e recentemente le terapie oncologiche, dove vi è la concreta possibilità di sostituire la chemioterapia.

Una vera e propria rivoluzione che si realizza tra gli anni Sessanta e gli anni Novanta del XX secolo, con il capovolgimento del modello concettuale di riferimento e che contribuisce a spostare questa scienza da una posizione ultraspecialistica e, tutto sommato, marginale (l'immunologia nasce come scienza dei vaccini e dei sieri iperimmuni), a una centrale, nel cuore stesso della comprensione della fisiologia di tutti gli esseri viventi e della medicina.

Tutto avviene con una tale rapidità inusitata che la nostra cultura medica ufficiale si viene a trovare in posizione arretrata sia con le istituzioni universitarie sia con il curriculum degli studi medici: basti pensare al fatto che in Italia, l'immunologia, è diventata materia di insegnamento obbligatorio nella Facoltà di Medicina solo verso la fine degli anni Ottanta.

A centro di questa rivoluzione c'è il pensiero di un individuo eclettico e stravagante, **Niels Kaj Jerne**, prima dedicatosi al commercio delle banane con il padre, poi iscritto a Chimica e ritiratosi senza dare un esame, poi dedicatosi ad un percorso di studi filosofico-linguistici e alla fisica – ed infine arrivato tardi alla medicina (si è laureato a circa 40 anni). Si potrebbe asserire che proprio a causa di questo originale percorso di studi e ricerche - non disgiunto da una genialità che nessuno studio ti può dare (cfr. Marconi un altro geniale autodidatta) - Jerne sviluppa i concetti e le teorie che saranno al centro della ricerca degli ultimi trent'anni e che condurranno alla rivoluzione scientifica del cosiddetto **Dogma Centrale della Immunologia**, ossia la teoria del network e della selezione clonale.

Riceverà il premio Nobel per queste idee sviluppate nel 1955/60 nel 1984, tanto ci vorrà affinché le successive scoperte confermino la genialità di questa impostazione teorica della nuova scienza.

### **2.1 Le fasi storiche dell'immunologia**

#### **Il vaiolo e la memoria immunologica**

La caratteristica di non subire per la seconda volta una malattia già affrontata, ovvero “essere immuni”, come veniva chiamato il fenomeno della memoria, fu notata da Tucidide nel suo racconto della guerra del Peloponneso.

Già nell'antichità si era notato che, nella maggioranza dei casi, coloro che facevano parte di una seconda ondata dell'infezione, erano affetti da una forma attenuata della malattia rispetto a chi si era infettato precocemente ed aveva dovuto subire una forma più virulenta (in un certo senso questa osservazione sarà alla base del fenomeno dei passaggi successivi in coltura, per provocare il fenomeno della attenuazione, v. il vaccino antirabbico).

Questa intuizione fu anche alla base della pratica vaccinale antivaiolosa dei cinesi e dei turchi che la applicavano alle donne per preservarne la bellezza, e venne importata in Inghilterra come si apprende nei diari di Lady Mary Wortly Montague.

Noi europei collochiamo la nascita dell'immunologia nel 1798, quando il medico inglese Edward Jenner, presentò al mondo occidentale il primo vaccino che conferiva immunità contro il vaiolo. Jenner non aveva scoperto nulla, ma era a conoscenza di queste antiche pratiche diffuse in Occidente e in Oriente che davano una qualche protezione verso le forme più gravi della malattia. La sua iniziativa offrì semplicemente una soluzione diversa a una pratica diffusissima in tutto il mondo.

Come accennato, da tempo i cinesi praticavano l'inoculazione di croste di vaiolo o, anche, l'insufflazione di materiale infetto nel naso, tramite un tubicino d'argento e la pratica era diffusa anche in Africa ed in Inghilterra, dove, nel corso del XVIII secolo, le epidemie di vaiolo, su dieci persone colpite, ne uccidevano due sfigurando le rimanenti.

Nel 1722, persino i Principi del Galles avevano acconsentito all'inoculazione, nella cute dei propri figli, di croste di vaiolo, di solito prelevate da persone che avevano avuto la malattia in forma relativamente benigna. Tale pratica non era però sempre efficace, né molto sicura.

Il colpo di genio di Jenner partì dalla constatazione che nelle zone di campagna dove c'era il vaiolo bovino l'incidenza del vaiolo umano era minore.

Egli tenne conto dei racconti sulle mungitrici, che sostenevano che queste avevano una pelle così bella e non rovinata dalle lesioni causate dal vaiolo, grazie all'esposizione al vaiolo bovino.

Di qui l'idea di smettere di inoculare croste di vaiolo umano e, al loro posto, usare materiale infetto da vaiolo vaccino.

Dopo la pubblicazione del rapporto con cui Jenner annunciava i positivi risultati ottenuti con il vaiolo della vacca (cowpox), la pratica si diffuse con una rapidità impressionante, ma la grandezza del risultato pratico ottenuto non era supportata da un'adeguata conoscenza sul come e sul perché il vaccino funzionasse. Funzionava e basta.

Tale procedura è stata usata fino alla fine del 1970, quando, grazie agli enormi sforzi della Sanità Mondiale è stato eradicato il vaiolo.

Questa è stata una delle prime sperimentazioni nello studio dell'immunità acquisita e della memoria immunologica, ed è stato un successo spettacolare.

Il vaiolo bovino protegge contro l'infezione del vaiolo, e ci fornisce informazioni importanti riguardo al sistema immunitario, perché ora sappiamo che il vaiolo bovino è strettamente correlato al virus del vaiolo umano, avendo alcuni antigeni in comune e inducendo così una immunità protettiva crociata verso entrambi i virus.

### **Nasce l'immunologia, quale branca medica della batteriologica**

Alla fine del XIX secolo, il francese Louis Pasteur, i tedeschi Robert Koch, Paul Ehrlich ed Emil von Behring, il russo Ilya Mechnikov, diedero vita a una serie di studi e di sperimentazioni mettendo a punto teorie, spesso contrastanti, sui meccanismi fisiologici alla base di una malattia infettiva.

Con L. Pasteur e R. Koch, la scienza acquisisce la prova sperimentale che esiste un mondo microscopico capace di provocare malattie (postulati di Koch): compito principale della scienza diventa quello dell'isolamento dei diversi ceppi di microrganismi, scoprendone la variabile pericolosità per l'organismo umano.

Nel 1880, L. Pasteur identificò il microrganismo responsabile del colera dei polli, dimostrando che l'inoculazione di un ceppo meno virulento proteggeva il pollo da un successivo contatto con un ceppo più virulento. Con questo esperimento venne fornita la prima spiegazione scientifica dell'eccezionale esperienza di E. Jenner, aprendo la strada alla profilassi vaccinale usando ceppi con una virulenza attenuata, ma, al tempo stesso, capaci di fornire protezione immunitaria.

Quattro anni dopo, nel 1884, Ilya Mechnikov grande viaggiatore e ammiratore delle bellezze del Sud d'Italia, lavorando nel laboratorio marino di Messina, dimostrò l'esistenza di particolari globuli bianchi, capaci di fagocitare batteri e altro materiale estraneo, li battezzò macrofagi. Lo zoologo russo si trasferì successivamente a Parigi e collaborò a lungo con Pasteur presso il nascente "Institute Pasteur". Dai lavori di Ilya Mechnikov e della sua Scuola verranno contributi essenziali allo studio della risposta immunitaria di tipo cellulare, ma, pochi anni più tardi, a Parigi e in

Germania vi furono alcune scoperte che aprirono una nuova epoca.

Nel 1888, il collaboratore di Pasteur, Emil Roux, dimostrò che nel siero di persone ammalate di difterite era possibile identificare le tossine che scatenavano la malattia. Sulla base di questa osservazione, due anni dopo, Emil von Behring riuscì a dimostrare che il siero di animali, contagiati da difterite e tetano, conteneva sostanze che erano in grado di incidere sulla malattia, fino a bloccarla, se somministrate a malati in fase iniziale.

Le sostanze capaci di fare il miracolo vennero battezzate antitossine o, più genericamente, anticorpi. Da quel momento si moltiplicarono le ricerche e le esperienze di laboratorio, messe in piedi nella convinzione che con la sieroterapia fosse possibile curare la maggior parte delle malattie.

In realtà, le cose non andarono così. Della sieroterapia, di sicuro ed efficace rimasero solo gli antisieri di cavallo per il tetano e la difterite, ma, da quel momento, nell'immaginario dei malati e anche dei medici e degli scienziati, l'anticorpo era diventato sinonimo di immunità.

Sul finire del secolo Paul Ehrlich elaborò una teoria sulla produzione degli anticorpi, ma nonostante ciò, agli inizi del secolo XX, l'influenza di Ilya Mechnikov e delle sue ricerche sui macrofagi era ancora viva nella comunità scientifica, al punto che nel 1908 il premio Nobel per la medicina venne condiviso dai due caposcuola, Mechnikov per i suoi studi sull'immunità cellulare ed Ehrlich per i suoi lavori sulla sieroterapia antidifterica e per la sua teoria sulla produzione di anticorpi.

In seguito, la teoria anticorpale, detta anche "umorale", ebbe maggior diffusione e influenzò la ricerca per tutta la metà del secolo XX.

### **La fase chimica: lo studio della struttura degli antigeni e degli anticorpi**

Dalla prima guerra mondiale fino alla fine degli anni Cinquanta, la ricerca in campo immunologico è dominata dalla sperimentazione biochimica.

Oggetto principale della ricerca è lo studio della reazione antigene-anticorpo, identificata come la chiave fondamentale della risposta immunitaria.

Stabilito che l'organismo è in grado di produrre anticorpi, ovvero sostanze neutralizzanti batteri, tossine e altro materiale estraneo, collettivamente definiti antigeni, come è possibile che per ogni antigene diverso venga prodotto un anticorpo specifico?

Nel 1940, Linus Pauling, un grande chimico, noto anche per il suo anticonformismo e impegno per la pace, nonché per i suoi studi sulla vitamina C, elaborò una risposta che sembrò la soluzione definitiva al problema: gli anticorpi assumono la forma specifica richiesta dall'antigene, poiché la proteina anticorpale, entrando in contatto con l'antigene, si modella sulla sua configurazione. Insomma, come nel caso di uno stampo.

**La teoria dello "stampo"**, a prima vista piena di buon senso, non dava risposta, però, a due osservazioni fondamentali:

1. Perché gli anticorpi sono sempre in quantità superiori agli antigeni. Come è possibile cioè che le copie siano superiori agli stampi?
2. Perché, se un antigene si presenta una seconda volta, come nel caso delle vaccinazioni, la risposta è più rapida e massiccia?

È chiaro che questi dati, di fatto sperimentali, non possono essere spiegati in base alla teoria dello "stampo".

Su questa critica, a metà degli anni cinquanta, si innestano le idee rivoluzionarie ed il contributo teorico formidabile del danese Niels Kaj Jerne che avvia la nascita di una nuova branca medica indipendente, l'Immunologia.

## 2.2 Nasce il dogma centrale dell'immunità

### La selezione clonale e la teoria del network immunitario

Niels Kaj Jerne, trasferito negli USA per continuare le sue ricerche sugli anticorpi, intraprese all'inizio presso la Facoltà di Medicina di Copenaghen, dove si era laureato nel 1951 proprio con una tesi "sulla avidità anticorpale" – presentò, nel 1955, sulla rivista dell'Accademia delle Scienze USA, un lavoro prettamente teorico.

Questo lavoro prendeva spunto da una contraddizione, che lo scienziato così descrive:

*"È stata accumulata una immensa quantità di dati sperimentali sul problema della formazione degli anticorpi, ma le teorie che offrono una interpretazione di base a queste osservazioni sono poche".*

L'obiettivo di Jerne non era quindi quello di aggiungere altri dati sperimentali, bensì di proporre "un modello per l'interpretazione delle principali caratteristiche della comparsa di anticorpi in risposta all'iniezione di un antigene in un animale".

Lo scienziato danese propose un cambiamento teorico radicale basato su due rovesciamenti: **anziché sull'antigene, concentrò l'attenzione sull'anticorpo; anziché pensare all'induzione di una proprietà (l'antigene che "stampa" il suo anticorpo specifico), teorizzò la selezione di proprietà già esistenti.**

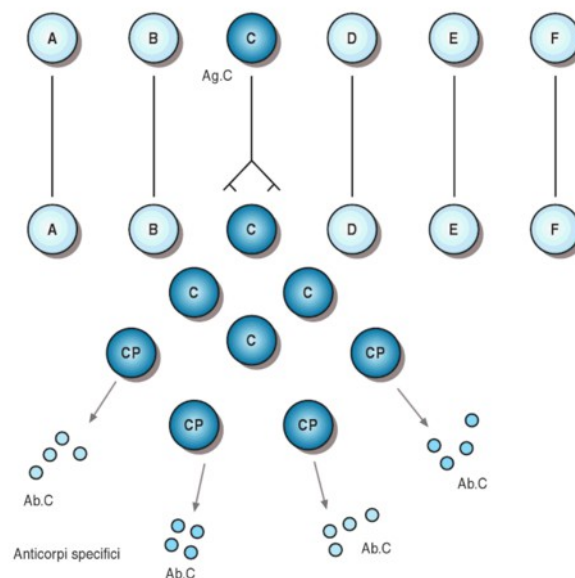
Jerne ipotizzò la preesistenza di anticorpi con diverse specificità, che venivano selezionati dall'antigene: in sostanza, non era la chiave a produrre la propria serratura, come nella teoria dello "stampo", ma era la serratura giusta che incontrava casualmente la propria chiave.

**Una teoria innovativa che aveva bisogno di un passaggio ulteriore: anziché pensare agli anticorpi, occorreva pensare alle cellule che li producono.**

Ed è ciò che fece quattro anni dopo, nel 1959 l'australiano Frank Macfarlane Burnet, proponendo **la teoria della selezione clonale.**

Secondo questa teoria, illustrata dalla figura 1, le cellule produttrici di anticorpi hanno recettori specifici e ogni cellula ne produce un solo tipo.

**Fig. 1 Teoria della selezione clonale di N. K. Jerne**



Se un antigene si adatta bene ad un recettore si lega ed induce la cellula a moltiplicarsi in una progenie di cellule tutte con la medesima specificità (CLONE). La specificità sono i recettori che per Jerne erano gli anticorpi.

Questo spiega perché gli anticorpi sono in numero maggiore degli antigeni e perché una successiva stimolazione antigenica produce una risposta rapida e potentissima.

Con Burnet si scopre una proprietà essenziale del sistema immunitario: la sua capacità di memoria. Il successivo passaggio è sempre opera di Jerne che, nel 1974, propone uno schema organizzativo e di funzionamento generale del sistema immunitario che fornisce la cornice teorica ai successivi, notevoli sviluppi.

Per lo scienziato danese occorre ampliare lo sguardo al sistema nel suo insieme. Da questo punto di vista due sono le caratteristiche centrali:

1. **il suo modello di funzionamento a rete;**
2. **la complessità e la diffusione del sistema nella gran parte dei tessuti dell'organismo.**

La **teoria della selezione clonale** risolve brillantemente il problema della produzione di anticorpi specifici senza ricorrere a teorie di adattamento della proteina anticorpale all'antigene (teoria dello stampo) o ad altre teorie che presuppongono meccanismi preesistenti complessi in grado di spiegare la variabilità adattativa della specificità anticorpale all'universo antigenico: l'incontro antigene-anticorpo è casuale e prevede lo stimolo proliferativo del clone cellulare che risulti specifico per l'antigene, fenomeno che spiega, fra l'altro, lo squilibrio quantitativo fra antigeni ed anticorpi.

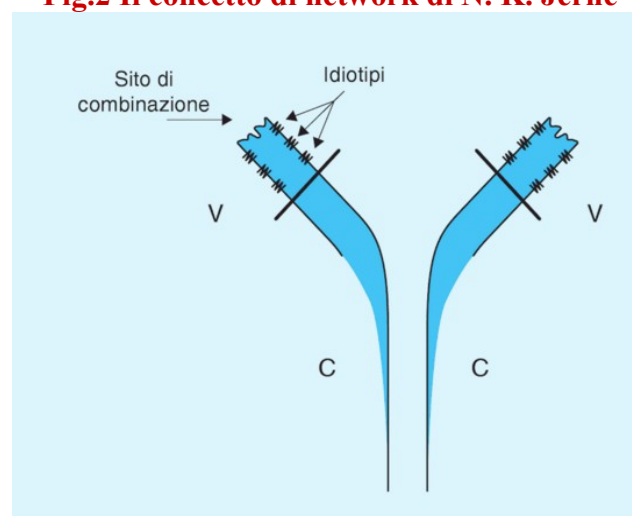
Pone però un problema circa la comprensione del meccanismo immunologico alla base della sintesi continua di molecole anticorpali con un grado di variabilità talmente alto da rendere possibile la presenza e quindi la selezione positiva di anticorpi **“casualmente specifici per un antigene”**.

Questo meccanismo, indubbiamente in linea con il concetto della **“casualità evolutiva”**, viene teoricamente concepito da Jerne e dal gruppo di ricercatori che lo sostengono come un sistema in equilibrio fra induzione e soppressione della risposta immunitaria: l'attività immunitaria contro un antigene sarà **il risultato di una perturbazione di questo equilibrio**.

**Il sistema immunitario**, secondo Jerne, **funziona, pertanto, come un network**, una rete di cellule e di molecole che è caratterizzata non solo dalla relazione antigene (notself) - anticorpo e quindi esterno-interno, ma anche dalla relazione interno - interno e cioè da come un anticorpo viene riconosciuto da altri anticorpi. Per Jerne, un anticorpo può riconoscere ed essere riconosciuto, essere un anticorpo e, al tempo stesso, un antigene per altri anticorpi. La rete, quindi, viene tenuta in equilibrio dinamico da questo complesso sistema di riconoscimenti.

Per illustrare questo concetto, Jerne correda la sua prolusione in occasione del conferimento del premio Nobel per la Medicina, assegnatogli nel 1984, con alcuni disegni di suo pugno.

**Fig.2 Il concetto di network di N. K. Jerne**



Schema della struttura di un anticorpo. In basso sono indicate le regioni costanti C, in alto le regioni variabili V. La freccia indica il sito di combinazione antigene-anticorpo; il tridente indica i siti idiotipici, le aree che, secondo Jerne, vengono riconosciute da altri anticorpi formando così un network.

Fonte: Jerne N.K., "Nobel lecture" 1984 161, disegno di Jerne.



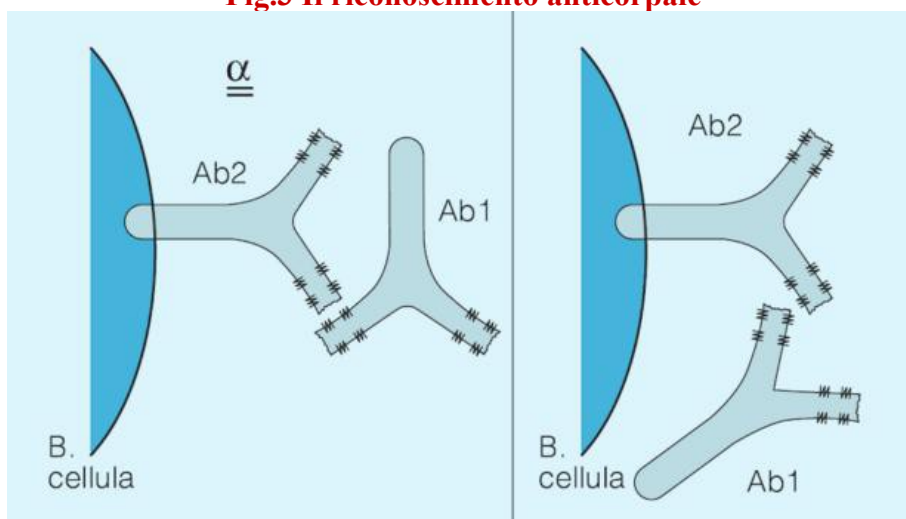
La conclusione di questo esame del comportamento degli anticorpi è che non ha senso distinguere tra chi riconosce e chi è riconosciuto. Così come non ha senso distinguere tra i siti di ricombinazione (cioè la zona che riconosce l'antigene) e quelli che lui chiama siti idiotipici (e cioè le zone riconosciute da altri anticorpi e che quindi funzionano come antigeni). "Ogni anticorpo - scrive - è una molecola multispecifica".

L'ipotesi che il network immunitario sia in uno stato di perpetuo equilibrio dinamico (che, sia chiaro, coinvolge self e not-self) verrà continuamente rielaborata nel tempo, per adattarsi alle scoperte scientifiche ed è tuttora sostenuta da molti ricercatori (G.W. Hoffmann nel suo testo "*Immune network theory*" ed. 2008, ne raccoglie le tesi), nonostante la presenza di alcuni paradossi.

La **teoria del network immunitario** viene sviluppata a partire dal 1970 - 74 principalmente da Niels K. Jerne e Geoffrey W. Hoffmann. La teoria afferma che il sistema immunitario è un "interacting network" ovvero una rete interattiva di linfociti e molecole/recettori che presentano una regione variabile (V).

Queste regioni V legano non solo molecole not-self, ma anche altre regioni V all'interno del sistema stesso. Il sistema immunitario viene per questa ragione visto come una rete, con i componenti connessi gli uni agli altri tramite interazioni del tipo V-V.

**Fig.3 Il riconoscimento anticorpale**



A sinistra un anticorpo (Ab1) è riconosciuto da un altro anticorpo (Ab2). A destra è invece descritta una situazione rovesciata: è Ab1 che riconosce Ab2. Il riconoscimento avviene sempre utilizzando i siti idiotipici presenti nella catena variabile dell'anticorpo. Un anticorpo quindi riconosce ed è riconosciuto. Di qui l'idea del sistema immunitario come rete. I successivi vent'anni di ricerca hanno dimostrato, con i dovuti aggiornamenti, che il sistema è una rete di molecole e di cellule, come teorizzato da Niels K. Jerne. Fonte: ibidem.

Hoffmann svilupperà una importante variante della teoria del network, la **teoria del network simmetrico** che include il fenomeno della bassa dose e dell'alta dose di tolleranza, prima descritto per un singolo antigene da Avron Mitchison e confermata da Geoffrey Shellam e Sir Gustav Nossal, ed il ruolo di supporto e di soppressione delle cellule T, il ruolo di cellule accessorie non specifiche nella risposta immunitaria.

In realtà, il primo ricercatore che suggerì che le interazioni del network idiotipico fossero simmetriche, fu Heinz Kohler, coinvolto nella ricerca sul network idiotipico precoce.

Geoffrey W. Hoffmann sviluppò una teoria dettagliata sul network immunitario basata su interazioni

simmetriche sia stimolatorie che inibitorie e di killing, che coinvolge vari tipi di cellule T soppressorie (s1, s2, s3) e T helper (h1, h2), il sistema di istocompatibilità MHC classe-II, e gli anticorpi IgG, più una serie di molecole e le cellule accessorie non specifiche (cellule A).

Nella primitiva versione del network simmetrico, un ruolo centrale nella teoria è svolto da specifici fattori prodotti dalle cellule T con un peso molecolare approssimativo di 50.000, denominati Tabs, che secondo la teoria avrebbero un'unica regione variabile (V) e probabilmente sono gli antesignani teorici delle citochine.

A differenza di queste, i tabs sono in grado di bloccare le regioni V e di avere un ruolo di stimolazione nei confronti delle cellule A una volta legati al recettore specifico. Le interazioni simmetriche di stimolazione seguono il postulato che l'attivazione delle cellule B, delle cellule T e delle cellule A coinvolga un cross-linking dei recettori.

Tutte queste ipotesi teoriche sul funzionamento del network immunitario e della sua natura simmetrica, ossia sul sistema di equilibrio dinamico fra stimolo e soppressione della attività immunitaria, ebbero una conferma nel 1994 nello studio della patogenesi dell'AIDS e successivamente nel 2002, quando venne definitivamente accertata la attività virale anti cellule T CD4+ (*L'HIV preferenzialmente infetta specifiche cellule T CD4+* -2002- Nature 417, 95-98).

Secondo la teoria del network immunitario la principale causa di progressione ad AIDS successiva all'infezione da HIV non sarebbe l'uccisione da parte del virus dei linfociti T helper infettati.

A seguito di un'infezione da HIV che riesce ad affermarsi, c'è una complessa interazione tra il virus HIV, le cellule T helper che infetta e le cellule T suppressor. L'attività immunitaria seleziona positivamente virus HIV con epitopi virali che mimano le regioni V della popolazione delle cellule T soppressorie. Una volta che ciò accade gli anticorpi anti-HIV possono eliminare, per cross-linking, la maggior parte della popolazione delle cellule T soppressorie.

Questo esita in una disgregazione del sistema immunitario e porta ad ulteriori reazioni contro il self, come quelle contro la popolazione di cellule T helper. A questo punto il sistema immunitario adattativo è interamente compromesso e sopraggiunge l'AIDS: altro risultato scoraggiante è che se l'AIDS è sostanzialmente una malattia autoimmune, è molto complesso lo sviluppo di un vaccino (G. W. Hoffmann, S. Muller, H. Kohler (2012) *Towards an HIV vaccine based on immune network theory*. Current Trends in Immunology 13, 69-79).

### 2.3 Sintesi della nuova teoria immunologica

1. il sistema è capace di auto-organizzazione e questa è la sua modalità normale di funzionamento;
2. il sistema funziona come organo di senso e, quindi, partecipa attivamente alla regolazione dell'equilibrio dinamico dell'organismo umano: si comporta da grande sistema di regolazione fisiologica che è influenzato ed influenza gli altri sistemi regolatori (il nervoso e il neuroendocrino);
3. le normali modalità di risposta immunitaria attivano circuiti che hanno polarità oscillanti: i sistemi centrati sui linfociti T helper (Th1, Th2, Th17, T-regolatori), ma anche quelli centrati su analoghe suddivisioni funzionali dei macrofagi e delle cellule dendritiche o su cambiamenti di polarità nella medesima cellula come nel caso delle T NK simili (T CD56+ con funzione NK), che possono produrre sostanze (citochine come IL-4 e IFN- $\gamma$ ) di significato opposto;
4. nella costruzione e nel mantenimento dell'equilibrio del sistema, centrale è la tolleranza acquisita dal sistema immunitario delle mucose (MALT) e segnatamente dalla sua porzione intestinale (GALT)
5. nella specie umana, il sistema ha una forte impronta sessuale: la diversità maschio-femmina influenza potentemente le modalità di risposta e la suscettibilità alle malattie.

Il sistema immunitario è anche un organo di senso particolare, deputato cioè al riconoscimento di stimoli "non cognitivi" come virus, batteri, tossine al fine di neutralizzarne la nocività per l'organismo umano. Un riconoscimento che non è un evento semplice e lineare, ma che può essere utilmente rappresentato inquadrandolo nella teoria del network di N.K. Jerne.

Con essa, infatti, il centro dell'attenzione si focalizza dall'esterno all'interno. Non è tanto importante l'antigene, ma come reagisce l'interno, come si riequilibra la rete dopo una stimolazione. Il riconoscimento dell'esterno, quindi, non solo non è tutto, ma è possibile solo riconoscendo se stesso.

Queste affermazioni potrebbero apparire mere disquisizioni teoriche; in realtà, orientano le ricerche per cercare di spiegare la memoria e la risposta secondaria anamnestic, anche le malattie autoimmuni, ovvero patologie da disregolazione del network immunitario.

N.K. Jerne nel 1984 ha ricevuto il premio Nobel non per una scoperta sperimentale, ma per una teoria, uno dei rarissimi casi, se non l'unico, di un Nobel attribuito ad una elaborazione teorica in medicina.

#### Una visione di insieme

Louis J. Picker e Mark H. Siegelman, patologi dell'Università del Texas, alla fine di un ampio capitolo da loro scritto per ***Fundamentals Immunology***, un volume che è la "bibbia" della materia, così concludono: «*In questa era di stupefacenti progressi nel campo della biologia molecolare e cellulare dei linfociti, è facile dimenticare che la nostra percezione dell'immunità a livello sistemico è ancora in uno stadio embrionale. La moderna immunologia ha solo una limitata comprensione della miriade di eventi fisiologici complessi che in vivo costituiscono la risposta immunitaria, protettiva o patologica che sia.*».

Recentemente, Polly Matzinger, in un appassionato commento apparso su Nature immunology, dice con molta chiarezza che bisognerebbe smettere di pensare che il tipo di attivazione del sistema immunitario dipenda prevalentemente dallo stimolo che ricevono le cellule. Centrale è invece il contesto e cioè fondamentali sono i segnali che emette il tessuto o i tessuti dove operano le cellule immunitarie. Al riguardo cita un lavoro di notevole importanza dove si dimostra che i macrofagi che risiedono permanentemente negli alveoli polmonari vengono tenuti sotto controllo dal contatto con una proteina di membrana delle cellule dell'epitelio degli alveoli. Questo contatto viene meno

quando arrivano patogeni e sostanze irritanti in grande quantità. A questo punto il macrofago si attiva, ma poi è lo stesso macrofago che induce la riattivazione della proteina di membrana che lo riporta sotto controllo. Insomma è l'interno che regola il segnale esterno, e cioè il tipo di risposta e il grado di intensità verso lo stimolo esterno.

Questa necessità di inquadrare l'attività del sistema immunitario in un ambito teorico generale, la cosiddetta “visione di insieme” , viene fortemente affermato da G.W. Hoffmann nel cap. I del suo testo *“Immune network theory”* .

### 3.0 Gli sviluppi matematici della teoria del network immunitario

La teoria della selezione clonale e del network immunitario chiudono definitivamente la via al “determinismo della risposta immunitaria”, concetto sottinteso alla teoria dello stampo ed aprono una vera e propria prateria ad una concezione statistico-probabilistica del sistema immunitario, nella sua organizzazione e nella elaborazione della risposta all'antigene.

L'attività del sistema immunitario diviene rigorosamente darwiniana, pilotata dal “**caso e dalla necessità**” i due pilastri della selezione naturale e si presta facilmente ad elaborazioni matematiche del modello teorico che Jerne, Hoffmann e tutti gli altri immunologi sviluppano.

G. W. Hoffmann elabora la teoria del network simmetrico con l'ausilio di modelli matematici, con lo scopo di esporre la memoria immune a qualsiasi combinazione di un alto numero di patogeni differenti.

Il sistema impiega un alto numero di stati stazionari stabili. Il sistema è inoltre in grado di operare uno switch tra gli stati stabili, come è stato sperimentalmente osservato. Per esempio basse o alte dosi di antigene possono provocare uno switch ad uno stato soppresso per quell'antigene, mentre dosi intermedie possono causare l'induzione dell'immunità.

La teoria del network immunitario ha inoltre ispirato un sotto-campo di algoritmi simili alla rete neurale artificiale slegati dalla immunologia biologica (Campelo F, Guimarães FG, Igarashi H, Ramírez JA, Noguchi S, *A Modified Immune Network Algorithm for Multimodal Electromagnetic Problems*, in *IEEE Trans. Magnetics*, vol.42, 2006, pp. 1111–1114, [DOI:10.1109/TMAG.2006.871633](https://doi.org/10.1109/TMAG.2006.871633), ISSN 0018-9464 ([WC](#) · [ACNP](#))).

Tutto questo comporterà, soprattutto a partire dagli anni '90, l'applicazione informatica dei modelli matematici immunitari, creando dei simulatori dell'attività immunologica, dove condurre un'attività sperimentale simil-biologica.

Sono i programmi AIS (Artificial Immune System) che avranno un periodo di enorme diffusione dagli anni '90 fino al decennio scorso, per poi rimanere relegati nell'ambito strettamente sperimentale.

Alcuni di questi simulatori costituiranno uno spunto per programmi di tutt'altra caratura, compresi quelli per la valutazione di variazioni economiche di borsa ed altre attività speculative ed assieme agli studi sulla rete neurale artificiale, costituiscono la base dello sviluppo odierno dell'Intelligenza Artificiale.

La fortuna di questi simulatori immunologici fu decretata da 2 eventi strettamente connessi:

- il vertiginoso sviluppo delle capacità di calcolo e di rappresentazione grafica dei sistemi informatici
- la necessità di stabilire i molteplici e complessi parametri di svariate attività immunologiche quanto più strettamente possibile in forma algoritmica per confermare le previsioni connesse alla teoria del network. Caso tipico è la impostazione per avallare le teorie sulla memoria immunitaria, ma di esempi se ne possono fare molti, da quello illustrato nel cap. 2.2 sull'HIV, all'immunità naturale o “innata”, all'autoimmunità etc.

L'A.I.S. non è la risposta definitiva ai problemi che pone la fisiologia e la biochimica delle funzioni immunitarie, ma può orientare la ricerca sperimentale, limitando alcune impostazioni erranee.

Tuttora nel mondo si svolgono convegni e corsi di A.I.S., come in Italia alla Liparischool estiva dedicata ai giovani ricercatori (v. sotto).

[Computational Life Sciences - Computational Immunology, Immunotherapy and Autoimmune Diseases July 25 - 31, 2018.](#)

L'articolo appresso illustrato è del 2007 e, anche se oggi può essere ritenuto in parte obsoleto,

riveste un certa importanza per la pubblicazione dei risultati ottenuti con un simulatore molto robusto, il software “**Sentinel**”, con cui gli AA affrontarono il problema della *memoria immunitaria*, tenendo conto di tutte le teorie sviluppate in questo campo. Lo studio affre anche una breve panoramica su altri tipi di simulatori.

# La memoria immunitaria: modello teorico e computazionale

Simon Garrett<sup>-1</sup>, Martin Robbins<sup>-1</sup>, Joanne Walker<sup>-1</sup>, William Wilson<sup>-2</sup>, and Uwe Aickelin<sup>-2</sup>

1. Computational Biology Group, Department of Computer Science, University of Wales, Aberystwyth, SY23 3PG. Wales, UK. {smg,mjr00}@aber.ac.uk
2. School of Computer Science (ASAP), University of Nottingham, Nottingham, NG8 1BB. England, UK. {w.wilson,uwe.aickelin}@notts.ac.uk

Art. pubblicato nel libro “In Silico Immunology” Springer Science – 2007

## Sunto

I modelli immunologici accurati offrono la possibilità di eseguire esperimenti ad alto rendimento con simulatori informatici in grado di prevedere, o almeno suggerire, l'andamento dei fenomeni in vivo.

In questo capitolo, confrontiamo vari modelli di memoria immunologica. Prima abbiamo testato e convalidato un simulatore immunologico sperimentale, sviluppato dagli autori, simulando diverse teorie di memoria immunologica con risultati noti.

Quindi usiamo lo stesso sistema per valutare gli effetti previsti da una teoria della memoria immunologica. Il modello elaborato è nuovo nel campo dei sistemi immunitari artificiali e confrontiamo in questo studio l'output del simulatore informatico con le misurazioni in vivo.

Sebbene la teoria appaia valida, suggeriamo di limitare i modelli di memoria immunologica ad utile strumento di supporto, non conclusivo senza la sperimentazione in vivo.

## Introduzione

Una delle caratteristiche fondamentali del sistema immunitario naturale (NIS) è la sua capacità di conservare una memoria delle precedenti infezioni, in modo che in futuro possa rispondere più rapidamente a infezioni simili [Sawyer 1931]. I meccanismi per la memoria immunologica sono ancora poco conosciuti e, di conseguenza, sono generalmente molto semplificati durante la costruzione dei sistemi immunitari artificiali (AIS).

Qui tentiamo di implementare modelli immunologici più dettagliati.

In futuro saranno richiesti simulatori sempre più sofisticati se ci sarà un aumento significativo di nuove idee nel campo teorico perché la simulazione computazionale è considerevolmente più veloce degli esperimenti di laboratorio. Finora, tuttavia, molte difficoltà sono state causate dalla limitatezza tecnologica dei programmi e i sistemi in uso sono in grado di generare simulazioni immunitarie globali di alto livello oppure simulazioni dettagliate e parziali, ma non entrambe.

Si dà per scontato di conoscere bene la differenza che intercorre tra un modello e la sua traslazione in un altro sistema. In AIS operano diverse traslazioni che interpretano con altro linguaggio (software) il metodo della selezione clonale, quello della selezione negativa e il network immunitario e forniscono gli strumenti computazionali per l'operatore AIS.

Ma le traslazioni non sono dei modelli. I modelli sono un tentativo di creare un sistema artificiale che mostra gli stessi comportamenti di un sistema naturale. Invece le traslazioni usano semplicemente il sistema naturale come ispirazione per un dispositivo algoritmico.

Qui ci concentriamo sulla creazione e l'uso di modelli da utilizzare in immunologia.

Lo studio di questi modelli potrebbe, come effetto collaterale, ispirare la elaborazione di nuovi metodi computazionali in AIS, ma questo non è l'obiettivo principale.

In questo lavoro viene descritto un sistema, ancora in fase di sviluppo, in grado di fornire simulazioni immunitarie rapide e dettagliate, che può suggerire effetti “in vivo” con sufficiente accuratezza ed essere utile come strumento di supporto immunologico.

Il campo prescelto è il “modello di memoria immunologica”.

In questo capitolo abbiamo lavorato per :

- Fornire una valutazione critica sulla memoria immunologica, sulle teorie note, e eventualmente sviluppare una nuova teoria della memoria immunologica che potrebbe

interessare i professionisti dell'AIS.

- Fornire una panoramica dei sistemi di simulazione immunitaria esistenti.
- Descrivere come abbiamo costruito e testato un insieme di modelli di memoria immunologica, e poi abbiamo ampliato questo approccio a un simulatore generico più avanzato.
- Descrivere come abbiamo testato la validità di una nuova teoria della memoria immunologica (elaborata da: Bernasconi et al. 2002). Per prima cosa abbiamo usato il simulatore immunitario avanzato per generare risultati informatici dalla nuova teoria. Quindi, poiché questa teoria è stata generata in risposta a risultati in vivo, abbiamo valutato l'affidabilità di tale teoria confrontando i nostri risultati computazionali con i risultati in vivo.

Il nostro simulatore avanzato è veloce, anche quando simula l'attività di  $10^8$  linfociti, il numero presente in un topolino.

Ha anche la capacità di simulare le concentrazioni di citochine, che si sono dimostrate vitali nella simulazione del lavoro di Bernasconi et al. (2002). La velocità e la flessibilità del simulatore consentono di applicarlo a compiti prima impossibili.

Inoltre, il nostro nuovo simulatore non è adatto solo ad un tipo unico di simulazione immunitaria, ma è progettato come uno strumento flessibile e utilizzabile per altre ricerche.

## 2) Le attuali conoscenze

### 2.1 Memoria immunitaria

La memoria immunitaria è uno dei tratti distintivi del sistema immunitario ancora oggetto di dibattito.

Come Zinkernagel et al. nel loro seminario sulla memoria immunologica virale (1996) hanno affermato "*...scartabellando attraverso libri di testo e testi autorevoli si scopre rapidamente che la definizione di memoria immunologica non è semplice*". Molte delle domande che essi sollevano su tale argomento sono ancora rilevanti dieci anni dopo.

Ci sono diverse teorie, alcune delle quali appaiono mutuamente esclusive, e ci sono prove sperimentali usate per supportare quasi tutte queste teorie. Prima di esaminare le tecniche per un modello computazionale di queste teorie della memoria, dobbiamo discutere le teorie stesse.

È ormai ampiamente accettato che esistono le cellule di memoria ipersensibili e sono state condotte ricerche esaurienti per descrivere i loro attributi e comportamenti, ad es. (L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development, Annual Review of Immunology* 23 (2005), 487-513).

Le cellule della memoria sono disponibili in almeno due varietà: le cellule B di memoria e le cellule T di memoria.

Queste cellule si formano durante (o subito dopo) una risposta immunitaria. Le infezioni virali acute inducono due tipi di memoria a lungo termine: l'immunità umorale, in cui le cellule B producono anticorpi che aggreghino le cellule infettate da virus e l'immunità cellulare, in cui le cellule T, attivate da specifici antigeni virali, uccidono le cellule infettate e producono anche citochine per impedire la proliferazione del virus e renderele cellule resistenti all'attacco virale.

Una volta che il sistema immunitario ha costruito una risposta primaria a un antigene, viene conservato un ricordo di quell'antigene per diversi anni o addirittura decenni (J. R. Paul, J. T. Riordan, and J. L. Melnick. *Antibodies to three different antigenic types of poliomyelitis in sera from north alaskan eskimos. Am. J. Hyg.* 54 (1951). 275-285.), (W. Sawyer. *The persistence of yellow fever immunity, J. Prev. Med.* 5 (1931) 413-428).

Un modo per misurare la forza di una memoria verso un antigene è il conteggio della popolazione delle cellule della memoria.



Questa cifra tende a diminuire rapidamente subito dopo un'infezione, raggiungendo un livello stabile che viene mantenuto per molti anni o decenni, anche in assenza di riesposizione all'antigene.

***La sfida che devono affrontare gli immunologi è scoprire come queste cellule vengono mantenute in vita.***

Sembra probabile l'esistenza di una sorta di meccanismo di omeostasi che mantenga una dimensione stabile della popolazione totale delle cellule di memoria. E' stato dimostrato che qualsiasi aumento causato da una risposta anamnesticamente ritorna rapidamente ad una ben definita concentrazione a riposo ([Tanchot & Rocha 1995](#)); anzi, è logico che il numero di cellule non possa aumentare indefinitamente all'interno del volume del sistema immunitario. Una possibile spiegazione di ciò è che le cellule di memoria (in particolare le cellule T) rilasciano citochine che hanno un effetto inibitorio su qualsiasi aumento eccessivo della popolazione linfocitaria.

Nel complesso, ciò che differisce nelle teorie della memoria immunologica è:

1. come si formano le cellule di memoria e se sono qualitativamente differenti dalle altre cellule B e T
2. come le cellule di memoria vengono mantenute a lungo termine, in modo che la memoria della risposta primaria non venga persa per morte cellulare.

### **La teoria delle cellule di memoria di lunga vita**

La maggior parte delle nostre cellule ha una durata della vita molto più breve di quella dell'organismo nel suo complesso, e così le cellule muoiono continuamente e vengono rinnovate. È stato ipotizzato che alcuni linfociti (sia le cellule B che le cellule T) altamente specifici per una fonte antigenica si differenziano in "cellule di memoria" molto longeve e che queste cellule di memoria siano altamente reattive allo stimolo antigenico originario. Questa teoria presuppone che non vi sia alcuna divisione cellulare e che le cellule vivano per un tempo molto lungo, preservando l'immunità per molti anni. Come può spiegarsi questo fenomeno?

Zinkernagel e altri affermano che non esistono prove convincenti per questo fenotipo della cellula di memoria ([Zinkernagel et al. 1996](#)) e l'opinione corrente è sufficientemente concorde, perchè l'evidenza sperimentale contraddice la teoria delle cellule di memoria a lunga vita, ([L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams, Antigen-specific memory B cell development, Annual Review of Immunology 23 \(2005\), 487-513](#)).

Una serie di esperimenti:

- 1) [D. Tough and J. Sprent. Turnover of naive- and memory- phenotype cells, J. Exp. Med. 179 \(1994\). 1127-1135](#)
- 2) [D. Tough, P. Borrow, and J. Sprent. Induction of bystander T-cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo, Science 272 \(1996\). 1947-1950.](#)

su topi ha dimostrato che le cellule T della memoria possono continuare a dividersi a lungo dopo una risposta primaria. Poiché viene mantenuta una popolazione stabile, ciò significa che anche le cellule di memoria devono morire a un ritmo noto per le altre cellule immunitarie e quindi non sono così longeve come inizialmente si riteneva.

Inoltre, è noto da decenni ([Sawyer 1931, Paul et al. 1951](#)) che l'anticorpo prodotto in risposta a un antigene può persistere a livelli significativi nel siero per anni dopo che si è verificata l'infezione iniziale. Gli anticorpi non possono sopravvivere nel corpo per un periodo particolarmente lungo, quindi possiamo concludere che vengono riprodotte le plasmacellule che sostengono queste concentrazioni.

Il problema è che le plasmacellule, nei topi, hanno dimostrato di avere una durata di vita di pochi mesi ([Slifka et al. 1998](#)) e che vengono create dalla differenziazione delle cellule della memoria.

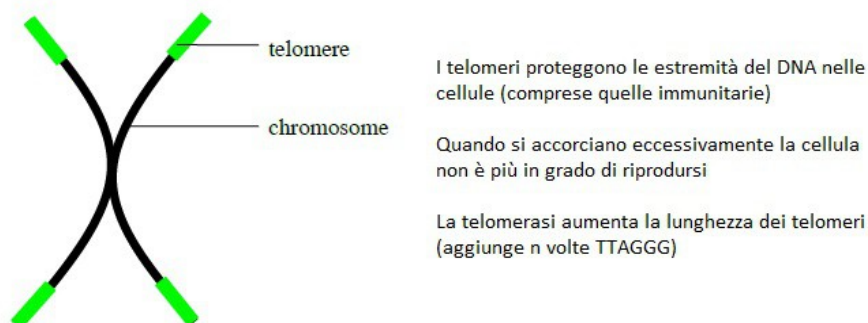
Questa evidenza frantuma la teoria delle cellule di memoria a vita lunga e ci porta alla conclusione che le cellule di memoria (sia B che T) vengono continuamente clonate per molto tempo dopo che l'infezione è stata superata.

### **Teoria della memoria emergente**

Una teoria simile afferma che non ci sono cellule di memoria speciali, piuttosto le cellule effettrici

si evolvono naturalmente verso cellule altamente specifiche e sono preservate dalla morte apoptotica attraverso una sorta di processo che coinvolge le telomerasi (N-P. Weng, L. Granger, and R. J. Modes. *Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997). 10827-10832).

Sebbene sia improbabile che la memoria emergente sia stabile di per sé (W. Wilson and S. Garrett, *Modelling immune memory for prediction and computation*. 3rd International Conference on Artificial Immune Systems (ICARIS-04). Springer-Verlag, 2004. pp. 343-352), il processo dovrebbe dare una spiegazione dell'evoluzione nel tempo del sistema cellulare della memoria: queste non sarebbero altro che una forma particolare di cellule effettrici.



**Figura 1.**

Ogni cellula del nostro corpo può riprodursi solo un numero predefinito di volte, in base alla lunghezza dei suoi telomeri. I telomeri sono sequenze di DNA terminali che proteggono le estremità dei nostri cromosomi, che sono “accorciati” ogni volta che la cellula si riproduce (Fig. 1), ossia “... ogni ciclo di divisione cellulare risulta in una perdita di 50 - 100 terminali nucleotidi dall'estremità telomerica di ciascun cromosoma.” (De Boer & Noest 1998).

Cosa accadrebbe se il grado di accorciamento dei telomeri fosse inversamente proporzionale all'affinità tra gli anticorpi e l'antigene della cellula? In questo caso, le cellule immunitarie fortemente specifiche tenderanno a sopravvivere più a lungo di quelle debolmente specifiche.

Questo principio non è nuovo in immunologia, de Boer ha suggerito un modello basato su concetti simili (De Boer & Noest 1998). Dutton, Bradley e Swain concordano sul fatto che il tasso di mortalità è una componente vitale necessaria (selezionatrice - ndr) per stabilire una memoria solida. “È logico che le cellule attivate debbano sfuggire alla morte cellulare se devono continuare ad essere cellule di memoria. Quindi, vi sono dei fattori di memoria che promuovono la sopravvivenza di determinate cellule T altrimenti suscettibili alla morte” (Dutton et al. 1998).

Considerate l'impatto di questa ipotesi nel contesto dei diversi tipi di cellule immunitarie. Grayson e altri affermano che “... i linfociti T di memoria sono più resistenti all'apoptosi rispetto alle cellule naive ... La ri-esposizione delle cellule di memoria all'antigene attraverso una seconda infezione provoca un'espansione più rapida e una più lenta contrazione della popolazione rispetto alle cellule naive.” (Grayson et al. 2002). Ciò indica che le cellule di memoria avrebbero tassi di mortalità più bassi (ma non “a zero”) e tassi di proliferazione più alti, quindi la popolazione cellulare si ridurrebbe in modo naturale alle sole cellule a vita lunga (cioè ad alta affinità) nel tempo.

La telomerasi potrebbe non essere l'unico meccanismo biologico in grado di spiegare l'evoluzione delle cellule immunitarie in cellule di memoria più longeve e con affinità più elevata, una spiegazione alternativa alla base della vita più lunga delle cellule di memoria è fornita da Zanetti (Zanetti & Croft 2001): “... la selezione delle cellule B destinate a diventare cellule di memoria avviene nei GC (centri germinativi) ed è controllata dall'espressione di molecole intracitoplasmatiche (Bcl-2 e Bcl-x) che prevengono una forma di morte cellulare ... insieme alla concomitante soppressione dei segnali dalle proteine della superficie cellulare che attivano la morte.”

Questa ipotesi differente da quella della telomerasi, conduce alle medesime implicazioni: le cellule di memoria sarebbero normali cellule immunitarie naturalmente evolute per sviluppare un tasso di mortalità inferiore, con elevata sopravvivenza, rispetto alle cellule effettrici.

Il problema della **teoria della memoria emergente** è di essere cellulo-specifica ma il meccanismo di selezione resta ignoto. In altri termini, come può una data concentrazione di citochine assicurare una vita più lunga per le cellule ad alta affinità rispetto a quelle ad affinità inferiore nel medesimo ambiente tissutale?

### **Teoria dell'antigene residuo**

Diversi rapporti suggeriscono che l'antigene proteico può essere trattenuto nel linfonodo (ad esempio [Perelson & Weisbuch 1997](#)), suggerendo che la normale funzione linfocitaria non può rimuovere tutte le tracce di una particolare tipo di antigene.

Questo è un risultato naturale del sistema immunitario, che viene espletato in particolari ambienti dell'organismo. Mentre la maggior parte del materiale antigenico verrà eliminato grazie alla risposta immunitaria, una parte sfuggirà a una risposta immunitaria localizzata abbastanza a lungo da poter eventualmente riprodursi (gli AA probabilmente pensano a virus come l'herpe simplex o zoster - ndr).

Il sistema immunitario stabilisce quindi rapidamente uno stato stazionario tra la risposta immunitaria e la dimensione della popolazione antigenica, al di sotto della quale assume uno stato anergico.

E' possibile che il sistema immunitario non rimuova completamente tutto il materiale antigenico dall'ospite, sia perché piccole concentrazioni di cellule not-self possono rimanere abbastanza a lungo in uno stato di segregazione per eventualmente riprodursi in seguito, sia perché il sistema immunitario stesso ha capacità di conservare parte dell'antigene nelle cellule follicolari dendritiche (FDC).

Queste FDC rilasciano lentamente il materiale antigenico nell'ospite, per stimolare una risposta immunitaria di basso livello.

Zanetti e altri affermano: *“L'opinione prevalente è che il mantenimento della memoria delle cellule B ... è una funzione della persistenza dell'antigene nelle FDC ... solo poche centinaia di picogrammi di antigene sono trattenuti a lungo termine nelle FDC, ma questi piccole quantità sono sufficienti per sostenere una risposta della memoria duratura ed efficiente.”* ([Zanetti & Croft 2001](#)).

In entrambi i casi, ciò manterrebbe il sistema immunitario abbastanza attivo da sostenere una popolazione adeguata di cellule di memoria.

Questa idea è stata supportata da ricerche che suggeriscono che le cellule B della memoria sono particolarmente sensibili all'antigene residuo ([J. G. Tew, M. H. Kosco, G. F. Burton, and A. K. Szakal. Follicular dendritic cells as accessory cells, Immunological Reviews \(1990\), 185-212](#)).

Negli ultimi anni, tuttavia, sono state presentate prove convincenti che suggeriscono che il ciclo vitale delle cellule T di memoria continua senza che sia presente alcun antigene specifico ([Lau et al. 1994](#)), il che significherebbe che queste cellule sono soggette ad altri stimoli che potrebbero prolungare la loro clonazione. Questa opinione è ampiamente accettata dagli immunologi ([Antia et al. 2005](#)), ma va notato che il dibattito è ampiamente aperto ([Manz et al. 2002, Zinkernagel 2002](#)).

Un'ulteriore obiezione deriva da una valutazione della efficienza di tale sistema. Come potrebbe essere efficiente, da un punto di vista evolutivo, spendere risorse su un sistema di memoria che è essenzialmente un metodo di apprendimento meccanico?

Sappiamo, dal Machine Learning, che l'apprendimento meccanico è il metodo meno efficiente per memorizzare le informazioni apprese e non ne consente la generalizzazione, anche se la **Teoria dell'Antigene Residuo** fornisce un elemento di generalizzazione, causato dalle precedenti infezioni che si sovrappongono alle nuove e implementano una risposta generalizzata (sia pur debole).

Purtuttavia è discutibile se vi sia una generalizzazione sufficiente a rendere questo sistema fonte efficace di memoria immunitaria.

Può sembrare che la persistenza dell'antigene sia importante per un modello di memoria immunitaria, poiché assicura che le cellule di memoria ad alta affinità siano stimolate alla sopravvivenza per lunghi periodi, ma esiste un'altra possibilità correlata.

Forse le cellule di memoria non hanno bisogno di stimolazione da parte dell'antigene; semplicemente proliferano periodicamente.

Questo potrebbe rappresentare un altro escamotage evolutivo per una cellula immunitaria che si differenziasse in una cellula di memoria?

Grayson et al. hanno identificato la discrepanza tra il comportamento a lungo termine delle cellule di memoria e delle cellule naïve e affermano che “... *le cellule di memoria subiscono una lenta proliferazione omeostatica, mentre le cellule naïve subiscono poca o nessuna proliferazione.*” (Grayson et al. 2002).

Se questa è la soluzione, le cellule della memoria hanno effettivamente bisogno della persistenza dell'antigene per sopravvivere?

Anche se la ri-esposizione all'antigene non è necessaria, Antia et al. concludono che “... *le stime per l'emivita della memoria immunitaria suggeriscono che l'antigene persistente o l'esposizione ripetuta all'antigene potrebbe non essere necessaria per il mantenimento della memoria immunitaria in vertebrati a vita breve ; tuttavia, ... l'esposizione ripetuta può svolgere un ruolo aggiuntivo nel mantenimento della memoria dei vertebrati a vita lunga.*” (Antia et al. 1998). Scegliamo di includere la persistenza antigenica nel modello qui discusso.

### **Teoria della rete (network) immunitaria**

La teoria della rete o network si basa sull'idea che il sistema immunitario instaura una memoria mediante stimolazione interna, non esterna.

Suggerisce che le cellule immunitarie, in particolare i linfociti, presentano proprie aree cellulari che sono antigeniche (ossia immunogene) ad altre cellule immunitarie. Ciò causa cicli di stimolazione e soppressione che, se avviati per contatto con una fonte antigenica esterna, vengono perpetuati e mantenuti anche in loro assenza, attivando una forma di memoria (Farmer et al. 1986).

Si ritiene che una rete di interazioni tra le cellule immunitarie sia alla base di un'omeostasi del pool di memoria (Zeng et al. 2005, Schluns & Lefrancois 2003), e alcune cellule immunitarie sono persino in grado di formare in vitro reti fisicamente collegate da un'insieme di nanotubuli (Watkins & Salter 2005), ma poche prove sono state pubblicate di recente nelle principali riviste di immunologia per un forte ruolo di tale tipo di co-stimolazione sopra descritta.

### **Teorie della memoria eterologa e policlonale**

E' stato osservato che durante una risposta immunitaria, anche le popolazioni di cellule T della memoria non correlate all'antigene possono espandersi (D. Tough, P. Borrow, and J. Sprent. *Induction of bystander T-cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo*, Science 272 (1996), 1947-1950.) (Bernasconi et al. 2002), suggerendo che forse la memoria sierologica potrebbe essere mantenuta da un grado di **stimolazione policlonale** (quindi aspecifica in parte!!) durante qualsiasi risposta immunitaria.

Sono stati suggeriti due possibili meccanismi per spiegare questi risultati: Stimolazione di cellule circostanti e stimolazione per cross-reattività (Antia et al. 2005).

La **teoria della Stimolazione di cellule circostanti** (Stimulation bystander) suggerisce che le cellule T specifiche per l'antigene producono una citochina che in qualche modo stimola tutte le cellule T di memoria particolarmente sensibili e circostanti a dividersi.

È stato suggerito che la stimolazione delle cellule circostanti (bystander) potrebbe essere responsabile di una continua clonazione delle cellule B e delle cellule T di memoria, (Bernasconi et al. 2002). I risultati di questo importante lavoro hanno mostrato che se le cellule B di memoria sono simultaneamente esposte a un antigene a cui non sono specifiche e alla citochina IL-15, subiranno un'espansione clonale. Questa abilità è stata mostrata come unica per le cellule B di memoria e non poteva essere ripetuta con le loro equivalenti naïve.

La **teoria della stimolazione per cross-reattività** (Cross-Reactive Stimulation) è basata sulla speculazione che le cellule di memoria potrebbero essere più sensibili a stimolazioni scarsamente specifiche rispetto alle cellule naïve, e potrebbero pertanto essere stimolate da antigeni diversi, forse anche auto-antigeni. È stato dimostrato sperimentalmente che le cellule T di memoria specifiche per un antigene possono essere direttamente stimolate da un diverso antigene estraneo (L. Selin, S. Nahill, and R. Welsh, *Cross-reactivities in memory cytotoxic t-lymphocyte recognition of*

*heterologous viruses*, J. Exp. Med. 179 (1994), 1933-1943).

Entrambe queste teorie sono esempi di **memoria eterologa**. In altre parole, suggeriscono che una volta create, le cellule T di memoria possono essere stimulate in modo aspecifico durante le risposte immunitarie ad un antigene estraneo. La differenza è che in un caso le cellule sono direttamente stimulate dall'antigene e nell'altro (stimolazione policlonale) sono stimulate dalle citochine rilasciate da altre cellule antigene-specifiche.

### **Perpetuazione della memoria in generale**

Sembra probabile che una, alcune o tutte le teorie di cui sopra abbiano una base di fatto, ma ci sono altri problemi generali di perpetuazione della memoria. Esistono numerosi problemi con le attuali teorie sulla perpetuazione della memoria delle cellule B. Questi derivano da un apparente paradosso che viene osservato nelle misurazioni delle concentrazioni di anticorpi nel siero nei mesi successivi a un'infezione.

È noto da decenni (W. Sawyer. *The persistence of yellow fever immunity*, J. Prev. Med. 5 (1931) 413-428), (J. R. Paul, J. T. Riordan, and J. L. Melnick. *Antibodies to three different antigenic types of poliomyelitis in sera from north alaskan eskimos*. Am. J. Hyg. 54 \*1951\* 275-285.) che l'anticorpo prodotto in risposta a un antigene può persistere a livelli significativi nel siero per anni dopo che si è verificata l'infezione iniziale. Gli anticorpi normalmente vengono metabolizzati e non possono sopravvivere oltre un certo periodo di tempo, quindi possiamo concludere che vi è una produzione di plasmacellule a sostenere queste concentrazioni.

D'altronde è stato dimostrato che le plasmacellule nei topi vivono solo per pochi mesi (M. K. Slifka, R. Antia, J. K. Whitmire and R. Ahmed, *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*, Immunity 8 (1998), 363-372), e che vengono prodotte solo tramite la differenziazione delle cellule di memoria. Questa evidenza contraddice la teoria delle cellule B di memoria a vita lunga e ci porta alla conclusione che le cellule B di memoria "come le loro equivalenti cellule T" vengono continuamente clonate a lungo dopo la fine di una infezione.

### **Riflessioni personali**

*Nella sua elaborazione teorica del network immunitario, Jerne afferma un concetto che è nel cuore della teoria, ossia che non ha senso distinguere tra chi riconosce e chi è riconosciuto.*

*Così come non ha senso distinguere tra i siti di ricombinazione (cioè la zona che riconosce l'antigene) e quelli che lui chiama siti idiotipici (e cioè le zone riconosciute da altri anticorpi e che quindi funzionano come antigeni). "Ogni anticorpo - scrive - è una molecola multispecifica".*

*Jerne parlava di anticorpi, figura ottocentesca tuttora fondamentale nel descrivere l'attività immunologica.*

*In realtà, noi oggi, dovremmo parlare di recettori di membrana e solubili (gli anticorpi) in grado di cross reagire con altre strutture glico- e lipo- proteiche, in un sistema in perfetto equilibrio dinamico.*

*Nell'elaborare una "teoria della memoria" dovremmo tenere presente la stessa assenza di distinzione che fa N.K. Jerne tra chi riconosce e chi è riconosciuto o meglio tra **self e not-self**.*

*Quando questo interessante articolo sull' AIS e la memoria immunitaria è stato scritto, nel 2008, non era ancora ben definito in Immunologia il capitolo del **Microbioma**, che costituisce, a mio parere, una pietra miliare a favore della concezione che Jerne esprimeva con la teoria del Network.*

*A tutt'oggi, nell'8<sup>a</sup> edizione del testo "**Immunobiologia di Janeway**", ed. 2014, non viene affrontato il problema della massa del cosiddetto not-self che costituisce, secondo la visione corrente, un organo immunologico, appunto il microbioma e nel cap. 12 "Il sistema immunitario delle mucose" si fa cenno unicamente al Microbiota, cioè ad una massa antigenica abbastanza vasta con cui il sistema immunitario si confronta in una specie di scontro perenne.*

*Eppure si sapeva già che il sistema della immunità delle mucose "MALT" costituisce una barriera difensiva che si estende per 400 m<sup>2</sup> nell'uomo adulto e che, a secondo dell'apparato interessato, prende il nome di BALT (mucosa bronchiale), GALT (mucosa intestinale, dove risiede oltre il 60% dell'intero sistema immunitario), NALT (mucosa nasale) e VALT (mucosa vaginale). Le strutture del*



GALT ed, in particolare, le Placche del Peyer (PP) e l'appendice rappresentano i siti più studiati di tale sistema difensivo.

Nelle placche del Peyer (PP) gli antigeni orali (sia alimentari, sia microorganismi vivi o morti) vengono captati da cellule epiteliali M (membranose), associate alle strutture follicolari. Le cellule M, a loro volta, delimitano delle tasche nelle quali sono contenuti T linfociti "helper" (Th) e B linfociti. I B linfociti "memoria" contenuti nel contesto delle tasche presentano gli Ag ai Th secondo i principi della restrizione governata dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. L'attivazione dei Th1 porta alla produzione della interleuchina IL-2, potente fattore di sopravvivenza e proliferazione dei T linfociti. Sull'altro versante l'interazione B-T può anche esitare attraverso il rilascio di segnali negativi (espressione del recettore CTLA-4 linfocitario) nell'anergia e/o apoptosi dei linfociti Th. Tale fenomeno di tolleranza immunitaria può proteggere l'ospite nei confronti di una risposta immunitaria abnorme in seguito, ad esempio, ad una massiva penetrazione orale di Ag solubili. Il "core" funzionale delle PP è costituito dai centri germinativi dei follicoli secondari nei quali si generano B linfociti produttori di immunoglobuline (Ig) con una predominanza di IgA secretorie dimeriche. Tutto ciò che viene elaborato nelle mucose e a sua volta è scambiato continuamente con una azione di ricircolo linfocitario con le stazioni interne dell'organismo (linfonodi, milza etc.)

Anche da queste scarse notizie si evince la complessità del rapporto esistente fra la massa del Microbiota e il Sistema Immunitario, per cui il microbiota finisce per assumere le caratteristiche di un vero e proprio organo immunologico il Microbioma, dove maturano le cellule immunitarie e si formano le attività di stimolo e di inibizione alla base del Network.

Attualmente, per **microbioma umano** si intende l'enorme popolazione di batteri, funghi e virus che vive nel nostro corpo, soprattutto nell'apparato digerente, sull'epidermide, nel cavo orale, nell'apparato urogenitale, nell'apparato respiratorio. Questi microbi sono 20 volte più numerosi delle cellule del nostro corpo: parliamo di circa 200 bilioni di unità, di più di 1000 specie diverse in un essere umano adulto.

La variabilità di questa popolazione è semplicemente incredibile: si stima che solo il 17% dei ceppi batterici presenti sulla mano sinistra di un uomo sia presente sulla sua mano destra. Vista in quest'ottica, una persona non è soltanto un individuo della specie umana, ma un superorganismo costituito da numerosi ecosistemi, ognuno essenziale alla sopravvivenza del tutto.

Nella concezione di infezione è oramai entrato il concetto di **squilibrio del microbioma** (avallando in tal modo il concetto di equilibrio dinamico di Jerne). Infatti si è scoperto che certe patologie sembrano essere causate da squilibri nella popolazione di organismi che comunicano con l'ospite. In una ricerca di qualche anno fa' si è scoperto che il ruolo del microbioma non consiste solo nella "esclusione competitiva" di alcuni patogeni.

Recentemente Sarkis Mazmanian e June L. Round del California Institute of Technology hanno sperimentato che topi di laboratorio privati del microbioma non sono in grado di sintetizzare la molecola anti-infiammatoria IL-10, e tornano in grado di farlo se viene loro inoculata una nuova flora batterica.

Questo e altri dati farebbero supporre ciò che era impensabile fino a qualche anno fa; il corredo genetico del microbioma interagisce con l'ambiente in sincronia con il nostro corredo genetico. Avremmo in sostanza due genomi: il genoma umano (statico) e il microbioma (dinamico), e quindi le fluttuazioni nella popolazione che costituisce il microbioma si tradurrebbero nell'insorgenza di patologie (o nella loro remissione). Quindi l'abilità di governare tali fluttuazioni è nel corretto rapporto con il sistema immunitario, di cui il Microbioma è parte integrante.

A metà del 2012 sono stati individuati, con uno studio di 5 anni, i miliardi di organismi che vivono in simbiosi con ogni umano (Progetto Internazionale Microbioma Umano). La mappatura è descritta in due studi coordinati dagli Stati Uniti con Barbara Methè del Craig Venter Institute e Curtis Huttenhower dell'università di Harvard. Altri 14 lavori collegati sono stati pubblicati sulle riviste PLoS One, PLoS Genetics e PLoS Computational Biology.

Per analizzare il Dna del microbioma umano i ricercatori hanno raccolto microrganismi da 242 adulti in buona salute. I campioni provengono da 18 siti del corpo, fra cui apparato respiratorio,

*pelle, bocca e vagina e hanno permesso di calcolare che il microscopico 'zoo' che vive nell'uomo comprende 10.000 specie diverse.*

*A questo punto, la perpetuazione della memoria diventa un gioco da ragazzi, laddove il repertorio delle specificità recettoriali del sistema immune si viene a confrontare con una variabilità antigenica totale (self, not-self) enorme, dove non è più necessario ipotizzare l'esistenza di cellule della memoria "semi perenni": per una che scompare se ne possono formare decine stimulate dallo stesso antigene o da antigeni abbastanza simili. La quantità delle cellule necessarie viene regolata da quel complesso sistema di comunicazione che fa da stimolo o inibizione della proliferazione cellulare e produzione molecolare (anticorpi etc...).*

*Hanno ragione gli AA. di questo affascinante articolo, quando nel 2008, affermano che in tutte le teorie della memoria enunciate c'è qualcosa di vero, se non altro ciò che nelle sperimentazioni condotte viene scientificamente dimostrato.*

*Purtuttavia, allo stato attuale, possono essere rigettati tutti i tentativi di dimostrare che le cellule di memoria sono in grado di sopravvivere molto di più rispetto ai tipi cellulari da cui derivano.*

*Non ce n'è bisogno e che dovesse essere così lo sospettavano in molti, visto che già negli anni '80 si sapeva che gli anticorpi contro i gruppi sanguigni presenti in ognuno di noi (senza alcuna precedente immunizzazione) altri non erano che anticorpi antibatterici capaci di cross-linking nei confronti delle strutture glicoproteiche dei globuli rossi e che le cellule di memoria "antibatteriche" potevano essere il frutto di una riclonazione continua, mantenendo una adeguata concentrazione di anticorpi.*

*E che nella risposta contro un antigene batterico o virale ci potesse essere una forte componente aspecifica lo aveva teorizzato nel 1992, tramite modelli matematici, R. E. Langman ricercatore di The Salk Institute for Biological Studies, fautore della teoria della "memoria eterologa e policlonale" testè discussa. Un suo lavoro "Molecular economy and antibody function: the evolution of a Protecton" sarà pubblicato in una sezione successiva di questi appunti.*

Alessandro Martella

## 2.2 Breve panoramica sulla modellazione di un Sistema Immunitario Artificiale

### Modelli matematici

I modelli immunologici matematici sono spesso sviluppati per un'area di interesse altamente circoscritta; ad es. (A. Perelson, *Modelling viral and immune system dynamics*, *Nature* 2 (2002), 28-36), (D. J. Smith, S. Forrest, D. H. Ackley and A. S. Perelson, *Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination*, *PNAS* 96 (1990), 14001-14006). Generalmente si usano equazioni differenziali ordinarie (ODE) o equazioni differenziali parziali (PDE) per delimitare la dinamica immunitaria scelta.

Le equazioni sull'HIV di Perelson (A. Perelson, *Modelling viral and immune system dynamics*, *Nature* 2 (2002), 28-36) e la dinamica dell'influenza di Smith (D. J. Smith, S. Forrest, D. H. Ackley and A. S. Perelson, *Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination*, *PNAS* 96 (1990), 14001-14006) costituiscono la risoluzione della struttura di piccole parti delle dinamiche del sistema immunitario che ha sicuramente portato significativi benefici per la salute umana, ma che non costituiscono un modello generale del sistema immunitario nel suo complesso.

Quando si considera la complessità chimica del legame degli amminoacidi, non sorprende che molti si astengano dall'idea di modellare il sistema immunitario. Tuttavia, le simulazioni immunologiche sono possibili perché osserviamo effetti su grande scala (come le risposte primarie / secondarie) che sono poi modulate in misura maggiore o minore da processi su piccola scala, come la discussione di Perelson sul legame delle cellule B e T. Entrambi sono vitali per modelli veramente accurati, ma i modelli in scala leggermente più grande sono stati utilizzati per spiegare alcune caratteristiche generali del sistema immunitario (A. Yates, C.C.W Chan, R.E. Callard, A.J.T. George and J. Stark. *An approach to modelling in immunology*, *Briefings in Bioinformatics* 2 (2001), 245-257).

La memoria immunologica è stata teorizzata in questo modo; l'esempio classico è il lavoro di Farmer, Packard e Perelson (Farmer et al. 1986), ma ci sono anche tentativi più recenti di strutturare la memoria immunologica (Ahmed & Hashish 2003). Sebbene questi modelli dicano molto su alcuni dettagli, non sono destinati a essere modelli globali sulla memoria immunologica.

Ad esempio, l'importante lavoro di Antia, Ganusov e Ahmed sulla comprensione delle cellule di memoria T CD8 + (Antia et al. 2005) si basa su alcune equazioni relativamente semplici. Questo non vuol dire che sia facile generare tali equazioni (non lo è); piuttosto, stiamo dicendo che l'applicabilità di queste equazioni è limitata. In effetti, la difficoltà di costruire e gestire queste equazioni è proprio la ragione per cui a volte un approccio con una simulazione computazionale è più appropriato.

### Modelli computazionali

I modelli computazionali non sono ancora ben strutturati come i modelli matematici, ma sono di solito basati su studi di popolazione (entità che vengono monitorate mentre interagiscono liberamente tra loro), o automi cellulari (entità che vengono monitorate in una struttura a griglia discreta; consulta il sito: [https://it.wikipedia.org/wiki/Automa\\_cellulare](https://it.wikipedia.org/wiki/Automa_cellulare)) (S. Wolfram, *A new kind of science*, Wolfram Media Incorporated, 2002).

In primo luogo, è possibile definire, in modo informale, il comportamento di un sistema altamente complesso, senza definirlo in termini di equazioni ODE o PDE formali: possiamo creare una popolazione di entità trasformandoli da oggetti naturali a oggetti simili nella simulazione computazionale. Inoltre, molte ODE non hanno una soluzione analitica e possono essere risolte solo mediante analisi computazionale, in software come Matlab™ e Mathematica™.

In secondo luogo, alcune forme di sperimentazione informatica possono essere difficili nei modelli matematici e anche nel laboratorio di immunologia, come il tracciamento di una singola cellula B o un anticorpo nel corso della sua vita. È possibile, quindi, che i simulatori immunitari computazionali forniscano l'unico mezzo per indagare su alcune sfide immunologiche.

In tutte le simulazioni computazionali si ribadisce l'importanza della scelta del meccanismo di legame e del tipo di interazione cellula-cellula oppure cellula-antigene, (vedi Garrett 2003).

Notiamo che i pochi simulatori computazionali esistenti sono spesso poco sviluppati e non sottoposti a revisione paritaria da parte della comunità accademica.



**ImmSim:** Il lavoro di Seiden, Kleinstein e Celada su ImmSim è stato il primo vero tentativo di creare un modello teorico del sistema immunitario nel suo complesso ed è ancora l'unico simulatore ad essere stato sottoposto a revisione scientifica abbastanza ampia (Kleinstein & Seiden 2000, Kleinstein *et al.* 2003). È simile nello stile al lavoro di Farmer *et al.*, ma è una vera simulazione, non un insieme di ODE (equazioni differenziali ordinarie).

**Simmune:** Esistono almeno due simulatori di immunologia "Simmune": la versione di Meier-Schellersheim (M. Meier-Schellersheim and G. Mack, *Simmune, a tool for simulating and analyzing immune system behavior*, 1999. <http://www-library.desy.de/>), sviluppata alla fine degli anni '90, e una versione di Derek Smith e Alan Perelson. Delle due, Meier-Schellersheim è la più avanzata, implementata come un automa cellulare completo con la capacità di definire quasi tutte le regole che l'utente desidera implementare, mentre Smith e Perelson è una simulazione Lisp relativamente semplice e inedita.

**Synthetic Immune System (SIS):** sebbene SIS sembri essere significativamente più veloce e potente, è meno funzionale. Simmune può simulare grandi numeri di interazioni complesse, mentre SIS è progettato solo per investigare le relazioni di self - notself. SIS è un automa cellulare e può essere trovato solo sul web, all'indirizzo:

[http://www.cig.salk.edu/papers/SISmanual\\_wp\\_M.pdf](http://www.cig.salk.edu/papers/SISmanual_wp_M.pdf) (il sito è stato modificato e questo lavoro cancellato – ndr).

**ImmunoSim:** Udayli e Rashbass con ImmunoSim si proponevano di fornire ai ricercatori una "area sperimentale immunologica" - un ambiente di modellazione personalizzabile che simulava tipi di cellule, recettori, ligandi, reazioni a cascata e ciclo cellulare, con esperimenti eseguibili al computer. Un requisito fondamentale era la dotazione di un'interfaccia puramente visiva, senza necessità di programmazione. Ha ricevuto il premio *Fulton Roberts Immunology* (due volte) dall'Università di Cambridge, ma non sembra disponibile come pubblicazione o sul web.

**Altri sistemi:** questi simulatori (Castiglione *et al.* 2003, Jacob *et al.* 2004) sono in scala minore rispetto ai precedenti, ma possono tuttavia essere utili in immunologia e nella chemioterapia e possono evidenziare i problemi da affrontare. Alcuni sono in grado di sottolineare l'importanza del meccanismo di legame, il tipo di interazione cellula-cellula e cellula-antigene, e molte altre caratteristiche (Garrett 2003).

### 3 Principi di base di un simulatore

Il nostro lavoro con una serie di simulazioni di base ha cercato di esplorare il comportamento su grande scala di alcune delle teorie appena studiate, mantenendo il modello il più semplice possibile. Le sole interazioni simulate sono quelle tra anticorpi e antigene.

I modelli descritti in questa sezione sono deliberatamente molto semplici.

Ciò è dovuto in parte al fatto che nessuno sa quanto debba essere complessa una simulazione per poter imitare con precisione i risultati in vivo, in parte perché con i modelli semplici si lavora con minore limitazione delle prestazioni computazionali e soprattutto perché ci permette di esplorare le dinamiche sottostanti alle semplici simulazioni immunitarie, in modo che le successive implementazioni possano essere viste come modulazioni di questo modello di base.

Si noti che la mancanza di complessità non dovrebbe essere vista come un'indicazione che i modelli descritti in questa sezione sono banali. Anche se semplici, è stata prestata molta attenzione per garantire che fossero i più realistici possibile.

Le simulazioni di base fungeranno anche da prima convalida per gli *algoritmi elaborati* per gli esperimenti più complessi. Non convalidano nessun altro aspetto degli esperimenti complessi.

È più semplice verificare e convalidare le prestazioni di un modello semplice rispetto a un modello complesso; quindi se i modelli complessi e semplici condividono comportamenti simili, la riuscita di questi convalida (parzialmente) il modello complesso.

Questo solleva un altro problema: come convalidare i modelli immunologici?

Se applichiamo la metodologia standard di Machine Learning, dove i “*modelli*” sono “*ipotesi*”, allora dovremmo fare qualche forma di *validazione crociata* n-volte per ottenere una misura dell'accuratezza delle ipotesi immunologiche elaborate. Ma come possiamo farlo se non abbiamo dati “appropriati” ben definiti?

In una certa misura, possiamo supporre che se un modello è in grado di *prevedere* ciò che sarà osservato in natura, allora il modello è in qualche misura convalidato. In primo luogo, la capacità di prevedere è una delle ragioni per la costruzione di modelli. Torneremo su questo punto più tardi.

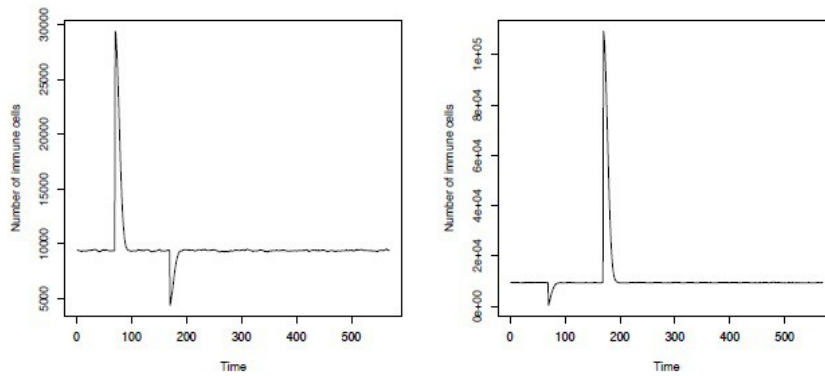
#### 3.1 Simulazioni di base: materiali e metodi

Ogni simulazione di base è stata creata su anticorpi ed antigeni e non è stato consentito a nessun modello di creare direttamente una memoria; la memoria doveva rappresentarne un'evoluzione. Ciò “*attenua*” la distinzione tra anticorpi, cellule B e cellule T al fine di esplorare gli effetti della proliferazione delle cellule immunitarie/anticorpi in risposta all'antigene. Per indicare questa “*approssimazione*”, chiameremo gli elementi del sistema immunitario simulati “elementi reattivi del sistema immunitario”, o RISE.

I RISE sono quelli che invecchiando hanno più probabilità di morire; la rimozione di un RISE è implementata tramite  $\text{rnd}().a > \text{rnd}().dr$ , dove  $\text{rnd}()$  è un generatore uniforme di numeri casuali,  $a$  è l'età del RISE misurata in numero di generazioni rispetto alla generazione iniziale, e  $dr$  è un numero intero del tasso di mortalità, che è stato impostato a 30. Sono stati aggiunti in numero costante 50 elementi di RISE ad ogni generazione.

Ciò ha portato a una popolazione stabile o che comunque torna stabile nonostante o dopo perturbazioni esterne.

La Fig. 2 mostra questo effetto: nonostante un grande afflusso di nuovi RISE (il picco positivo) e un piccolo abbattimento dei RISE (il picco negativo), la stabilità viene mantenuta. Anche se le dimensioni dei picchi o la loro successione temporale vengono invertite, si ottiene lo stesso risultato - si noti anche le differenze di scala tra le Figure 2a e 2 b, che mostrano che la dimensione della perturbazione è irrilevante. Questo è la realizzazione di una semplice popolazione omeostatica di RISE.



**Fig. 2 - La popolazione a riposo delle cellule B era in omeostasi. Questi grafici mostrano la stabilità della popolazione che è alla base di tutti i modelli che seguiranno. Qualsiasi modifica positiva o negativa delle dimensioni della popolazione (picchi positivi o negativi) viene rapidamente corretta e viene ripristinata la dimensione della popolazione stabile.**

Le popolazioni di antigeni vengono interamente "iniettate" nel sistema, in tempi predefiniti.

L'infezione primaria avviene sempre alla generazione 70, e l'infezione secondaria avviene alla generazione 120 (esperimenti 'smallGap'), oppure alla generazione 420 (esperimenti 'bigGap'), per testare le capacità di memoria a breve e lungo termine della popolazione.

Un antigene viene rimosso una volta legato ad un RISE e il legame potrebbe verificarsi solo quando la somiglianza tra i RISE e l'antigene è entro un valore 100. I RISE possono assumere qualsiasi valore compreso tra zero e 10.000 e l'antigene ha sempre un valore casuale di 3,3, fisso per tutti i test.

In tutti i casi assumiamo che i RISE con l'affinità più forte si legano all'antigene. Noi abbiamo implementato questa azione con una forma di selezione competitiva, per cui i RISE con legame più forte fra dieci tipi scelti casualmente, vengono ad essere quelli che si legano effettivamente. Una nostra simulazione più complessa, presentata più avanti in questo capitolo, usa anche la simulazione di una chemiotassi.

Per ciascun esperimento, abbiamo misurato il numero totale di RISE, il numero totale di antigeni e il numero di RISE con affinità negli intervalli, (0,01-0,1), (0,1-1), (1-10), (10- 100), (100-1000), (1000-10000) e (10000-100000). Abbiamo registrato queste informazioni in ogni generazione per 600 generazioni.

### 3.2 Simulazione di Base: esperimenti e test

#### Memoria per stimolazione esterna.

Questi esperimenti hanno testato la capacità delle simulazioni di base di memorizzare le infezioni per un breve e lungo periodo di tempo, supponendo che l'unica stimolazione sia esterna, cioè attraverso l'interazione antigenica:

- **Test di controllo** - Oltre al meccanismo di omeostasi, abbiamo testato un'implementazione standard della selezione clonale. Questa viene attivata dalla presenza dell'antigene, in modo che un RISE con una buona specificità produca molti cloni e un RISE con scarsa specificità produca pochi cloni. Inoltre, i cloni con buona specificità sono solo leggermente mutati rispetto alle loro cellule madri, tramite una Gaussiana centrata sulla cellula genitrice, mentre i pochi cloni di scarsa specificità sono spesso molto mutati, rispetto alla cellula genitrice. Questo assomiglia alla teoria della selezione clonale di Burnet (Burnet 1959) e funge da controllo per questi esperimenti. Poiché le cellule di memoria non vengono volutamente create, ci si aspetta che la popolazione RISE cancelli l'antigene e quindi dimentichi l'infezione.
- **Memoria emergente** - nei test della memoria emergente, quando un RISE è legato all'antigene, l'età del RISE viene ridotta in proporzione alla sua affinità con l'antigene, in modo che i RISE con miglior legame tendono a sopravvivere più a lungo - questo

implementava gli effetti della "preservazione" . Ciò dovrebbe preservare i RISE ad alta affinità in una certa misura, producendo una forma di memoria.

- **Antigene residuo** - una volta inoculata la popolazione antigenica, un singolo antigene è stato reintrodotta nella simulazione a intervalli di tempo casuali (in media ogni tre generazioni). Ciò potrebbe impedire la perdita della memoria dato che questo valore è considerevolmente più piccolo del  $dr$ ? Se sì, in quali condizioni? Si potrebbe sostenere che questo non rappresenta realmente l'antigene residuo, poiché gli antigeni vengono reintrodotti piuttosto che mantenuti nell'ambiente, tuttavia lo scopo di questo modello è dimostrare se una piccola quantità di stimolazione possa mantenere la memoria, non di dimostrare i meccanismi con cui l'antigene può stazionare nell'organismo, e quindi in termini pratici la reintroduzione svolge lo stesso ruolo del modello di mantenimento (presenza di una popolazione di antigene piccola e stabile), con il vantaggio di permettere di semplificare l'esperimento.

C'è qualche vantaggio nel coniugare la teoria della memoria emergente con quella dell'antigene residuo?

### Memoria per stimolazione interna

Questi esperimenti hanno testato gli effetti della stimolazione interna alle simulazioni di base, in modo che un RISE potesse interagire con un'altro RISE, anche in assenza di antigene. Sebbene l'interazione anticorpo-anticorpo non sia considerata una forma di memoria in natura, essa si verifica e probabilmente ha una qualche funzione. Questi test si proponevano di indagare su quale potesse essere quella funzione. I grafici descritti, della distribuzione del livello di affinità, sono di particolare rilevanza per questi esperimenti.

È importante notare che non usiamo il legame paratopo-paratopo qui: cioè non assumiamo che una catena leggera di anticorpo/RISE si leghi con la catena leggera di un altro anticorpo/RISE, per ragioni illustrate in Garrett-2003 (ad es. i problemi di feedback positivo). Invece spostiamo il legame ideale a 2500 (in un range di 10.000) in modo che un RISE con valore 1000 si leghi più fortemente con un altro RISE di valore 3500. Ciò significa che ci dovrebbe essere un ciclo di quattro RISE per far funzionare la memoria interna.

Questo implementa il legame tra paratopi ed epitopi, sebbene notiamo che esiste, nella simulazione una relazione funzionale tra le forme tridimensionali del paratopo e dell'epitopo, che è poco reale, ma è necessaria per mantenere semplice la simulazione.

### 3.3 Simulazione di Base: risultati

**Memoria per stimolazione esterna.** I risultati sono presentati in Fig. 3 e Fig. 4.

Queste sono una media di dieci cicli. Ricordando che la popolazione è stata completamente rinnovata in media ogni 30 generazioni, gli esperimenti a brevi intervalli (colonna sinistra dei grafici, 50 generazioni tra le infezioni) non avrebbero dovuto mostrare alcun ricordo dell'infezione precedente.

Nei grafici "**di controllo**" (in alto) vediamo effettivamente un leggero aumento della risposta, non statisticamente significativo - non c'è memoria delle precedenti infezioni. Le statistiche che abbiamo usato sono state il test non parametrico basato sui ranghi ossia il Test con segno di Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test), e i risultati sono tabulati nella Tabella 1.

Questo test ci ha permesso di decidere quando la differenza di altezza tra la risposte primaria e quella secondaria era significativa e il rapporto esprime l'entità di tale differenza. Questo test non parametrico è stato scelto perché è probabile che la risposta secondaria sia condizionata dalla primaria e che i dati non siano distribuiti normalmente.

I grafici di affinità in Fig. 4 indicano che c'è un aumento dei RISE che hanno affinità negli intervalli  $<0.1$ ,  $<1.0$  e  $<10.0$ , ma non c'è memoria tra le infezioni.

I risultati della "**memoria emergente**" mostrano una evidente risposta secondaria nell'esperimento *small gap* (50 gen.), poiché i membri della popolazione in grado di stabilire legami specifici erano mantenuti oltre 30 generazioni; tuttavia, questo effetto non è sufficiente a permettere alla memoria

di persistere nel *big gap* (350 gen.) perché gli anticorpi efficaci contro l'infezione primaria, tendevano a scomparire in quel periodo di tempo. Tuttavia, i risultati indicano che la memoria può essere conservata per almeno 50 generazioni.

Qui i grafici di affinità dimostrano che i RISE ad alta affinità sono mantenuti tra le 2 infezioni (primaria e secondaria), separate da un piccolo intervallo temporale e come questi tipi di RISE scompaiono nel lungo intervallo temporale per cui il sistema immunitario simulato debba ricominciare a trovare una risposta ad alta affinità all'antigene.

I test della memoria "*Antigene residuo*" hanno uno schema simile in Fig. 3, con la popolazione stimolata a sufficienza di continuo dall'antigene a basso livello per promuovere una risposta secondaria nell'esperimento *short gap* (50 gen.). Nell'esperimento *big gap* (350 gen.), tuttavia, l'effetto non è statisticamente significativo.

I grafici di affinità mostrano un elevato numero di RISE con affinità da media ad alta (negli intervalli <1, <10 e <100) ma indicano che i RISE ad affinità molto elevata ritornano a livelli inferiori entro 200 generazioni. Questo spiega perché la risposta anamnesticca non è statisticamente significativa quando l'infezione secondaria è separata da una grande distanza temporale.

Con la fusione delle 2 teorie "*antigene residuo*" e "*memoria emergente*", il risultato è diverso.

Si osservano forti risposte secondarie per entrambe *short gap* e *big gap*, anche se c'è un leggero aumento globale e sostenuto della popolazione RISE dopo la prima infezione (non torna allo stadio omeostatico).

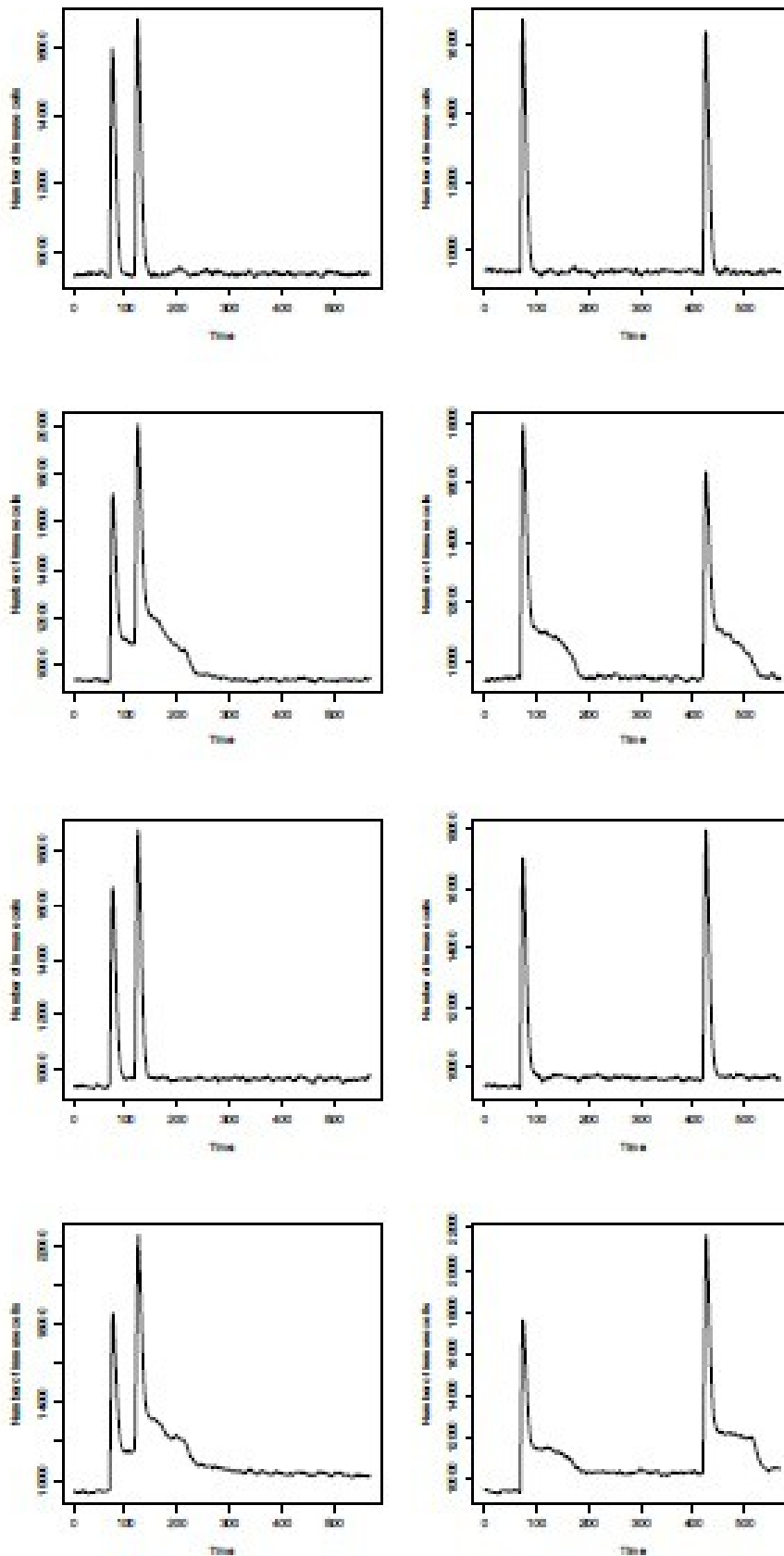
I grafici di affinità mostrano che i RISE ad affinità elevata <0,1 non tornano allo zero (omeostasi). Questo sembra essere cruciale nel mantenere una potente risposta secondaria, e dovrebbe trovare corrispondenza nell'esistenza di cellule di memoria ad alta affinità in natura.

Ci si potrebbe chiedere perché il fenomeno dell'*antigene residuo* non può spiegare da solo la memoria immunitaria. Se la quantità di antigene residuo fosse abbastanza alta, la risposta immunitaria sarebbe sufficiente per creare memoria di quella infezione?

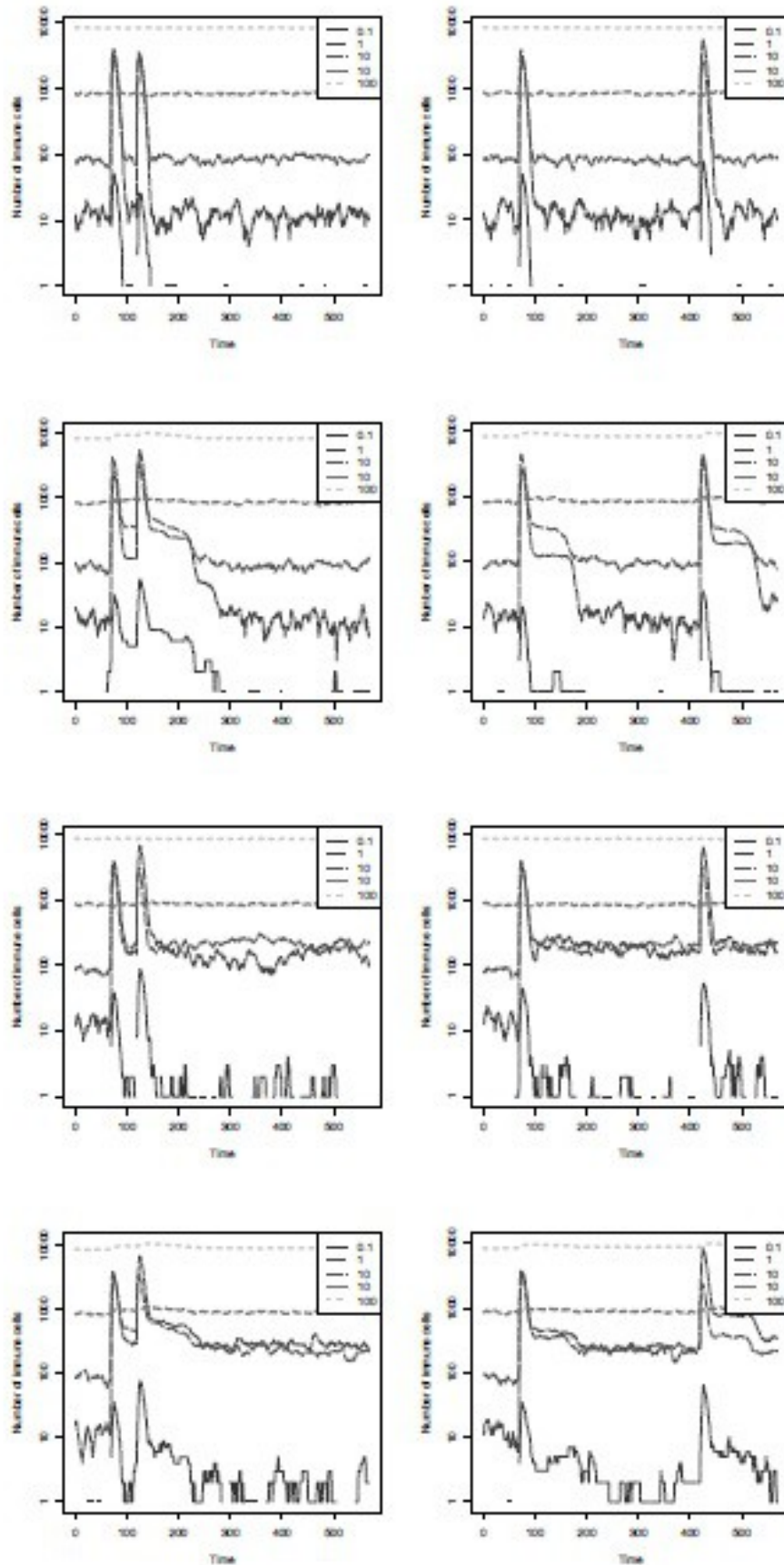
In effetti, questo è vero, ma al costo di un livello di popolazione anticorpale costantemente elevato, a livelli mai riscontrati in natura.

D'altronde, se l'infezione dovesse persistere agli stessi alti livelli, è ovvio che la memoria non andrebbe persa, perché l'infezione sarebbe continua e persistente, ma questo non è uno stato di cose realistico, ad eccezione di in casi patologici (cronicizzazione), come nei pazienti anziani infetti da citomegalovirus (Perelson 2002). Il livello scelto è tale da permettere lievi aumenti della dimensione della popolazione anticorpale: questa azione, però, è sufficiente a mantenere la memoria per un breve periodo, ma non a lungo termine.

Inoltre, l'*antigene residuo* non spiega perché le cellule più specifiche tendono a sopravvivere e le cellule meno specifiche tendono a scomparire; né spiega come le cellule di memoria possano formarsi naturalmente come risultato della maturazione delle cellule immunitarie. Di conseguenza, sia la riduzione dell'apoptosi (o meccanismo di mantenimento della memoria tramite *telomerasi*), sia il meccanismo di ri-stimolazione sono necessari per ottenere una risposta immunitaria efficace.



**Fig. 3** Grafici delle simulazioni teoriche, "Controllo", "Memoria emergente", "Antigene residuo" e "Entrambi" (dall'alto verso il basso e nell'ordine) per un piccolo intervallo temporale (50 generazioni, colonna sinistra) e un intervallo temporale più lungo (350 generazioni, colonna di destra), in media su 20 serie.  
 Asse X: Tempo; Asse Y: Numero delle cellule immunitarie



**Fig. 4** Grafici di affinità delle simulazioni teoriche, "Controllo", "Memoria emergente", "Antigene residuo" e "Entrambi" (dall'alto verso il basso, nell'ordine) per un piccolo intervallo temporale (50 generazioni, colonna sinistra) e un intervallo temporale più lungo (350 generazioni, colonna di destra), in media su 20 serie. Asse X: Tempo; Asse Y: Numero delle cellule immunitarie

Experiment	p-Value	99%	Ratio
None Small Gap	0.240	No	0.948
None Big Gap	0.955	No	1.011
Emergent Small Gap	0.0000957	Yes	0.852
Emergent Big Gap	0.225	No	1.067
Residual Small Gap	0.00318	Yes	0.890
Residual Big Gap	0.332	No	0.945
Both Small Gap	0.0000957	Yes	0.822
Both Big Gap	0.0000957	Yes	0.813
Network Small Gap	0.765	No	0.999
Network Big Gap	0.896	No	1.001
All Small Gap	0.0000942	Yes	0.850
All Big Gap	0.000315	Yes	0.832

**Tab. 1 Risultati del Test con segno di Wilcoxon per la differenza tra le dimensioni dei due picchi in ciascun esperimento. I valori di p sono mostrati a 3 cifre significative e indipendentemente dal fatto che la differenza possa essere considerata significativa al livello di confidenza del 99%. Più piccolo è il valore p maggiore è il grado di confidenza che ci sia una differenza tra le risposte primarie e secondarie, con 1.0 che è zero confidenza e 0.0 che rappresenta il 100% di confidenza.**

**Il rapporto dà la dimensione e la direzione della differenza tra i due picchi.**

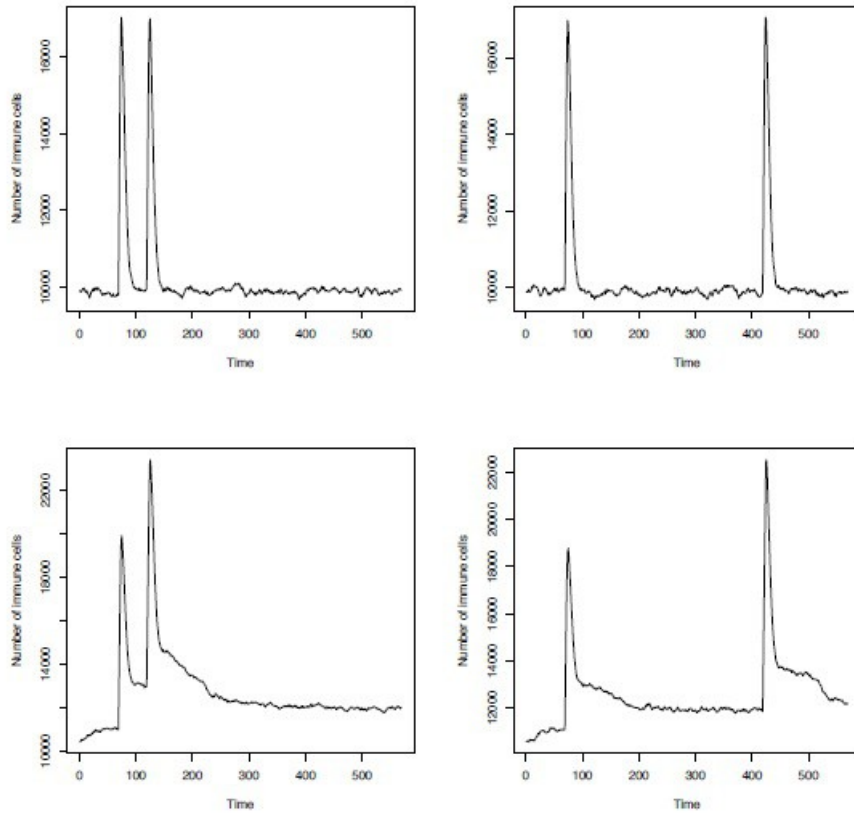
*Memoria per stimolazione interna.* I risultati sono presentati in Fig. 5 e Fig. 6. Per ciascuna analisi, ogni RISE ha effettuato un legame alla massima affinità con un altro RISE scelto casualmente fra dieci RISE. Non sembra esserci stato alcun effetto memoria; in effetti, sembra vero il contrario: non appena una sottopopolazione aumenta di dimensioni rispetto alla popolazione nel suo insieme, l'effetto network riduce le dimensioni di tale sottopopolazione. Ciò ha reso i livelli in Fig. 6 più stabili rispetto ai grafici comparativi di Fig. 4.

Concludiamo che gli effetti di memoria delle reti immunitarie sono limitati – almeno per i tipi di rete che abbiamo introdotto in questa ricerca.

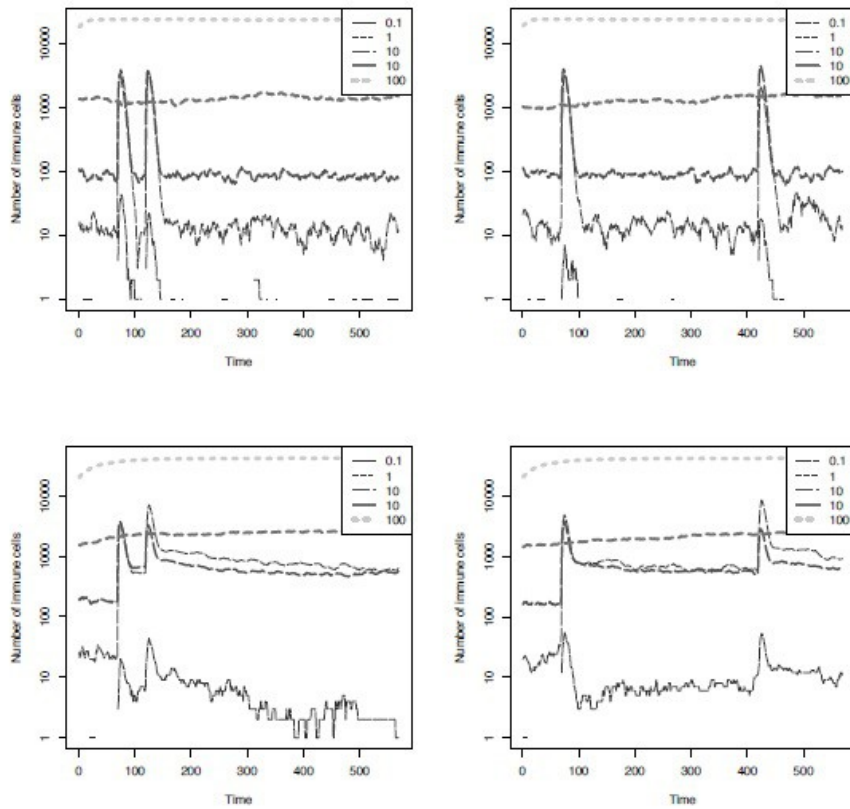
Poiché i nostri scopi in questi esperimenti di base sono di produrre modelli semplici di interazioni immunologiche, abbiamo adoperato il legame “non simmetrico, paratopo-epitopo”, in cui il legame di A verso B non implica che B lega A.

Al contrario, gli algoritmi di rete AIS tendono ad usare il legame paratopo - paratopo perché è più interessante in un'ottica computazionale, anche se è meno sostenibile da un punto di vista biologico.





**Fig. 5** Grafici delle simulazioni teoriche, "Network" e "All" (dall'alto verso il basso) per un piccolo intervallo temporale (50 generazioni, colonna sinistra) e un intervallo temporale più lungo (350 generazioni, colonna destra), su una media di 20 serie.



**Fig. 6** Grafici dell'affinità nelle simulazioni teoriche, "Network" e "All" (dall'alto verso il basso) per un piccolo intervallo temporale (50 generazioni, colonna sinistra) e un intervallo temporale più lungo (350 generazioni, colonna destra), su una media di 20 serie.

## 4 Sperimentazione con il simulatore Sentinel System

### 4.1 Materiali e metodi

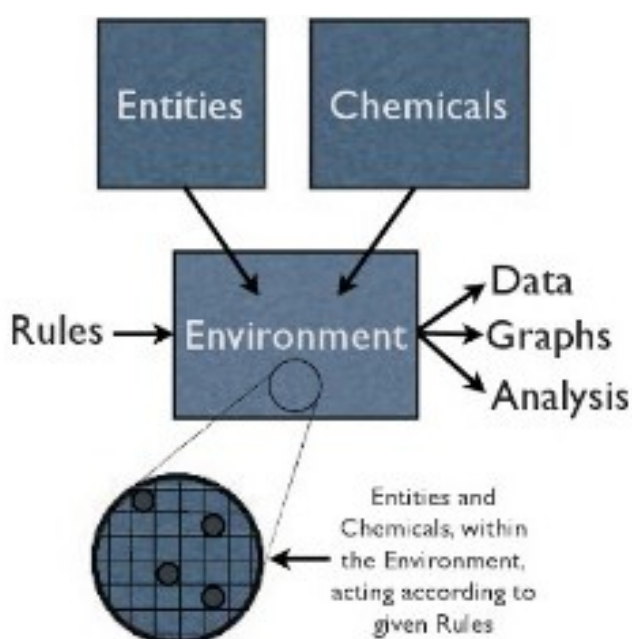
Le simulazioni che formano la base di questo documento sono state strutturate utilizzando il nostro software. "Sentinel" (fig. 7a).

Sentinel è una piattaforma di simulazione di sistemi complessi per l'immunologia e le ricerche AIS correnti, ed è attualmente un prototipo. Il suo design si basa in gran parte sui principi degli automi cellulari (consulta il sito: [https://it.wikipedia.org/wiki/Automa\\_cellulare](https://it.wikipedia.org/wiki/Automa_cellulare)), con l'ambiente diviso in una griglia discreta di posizioni. Le entità all'interno della simulazione sono libere di muoversi in questo ambiente, ma possono rispondere solo agli eventi che si verificano nelle cellule strettamente vicine. I "motori", come quelli usati nei giochi su computer per gestire grafica, fisica, ecc., sono utilizzati per gestire le interazioni fisiche e chimiche che avvengono all'interno di questo ambiente.

Il motore fisico consente una simulazione accurata delle proprietà fisiche degli agenti, limitando i loro movimenti in base ad attributi quali la massa, le dimensioni o la produzione energetica. Mentre molte simulazioni o modelli di equazioni differenziali si basano esclusivamente su cellule che presentano una qualche forma di movimento browniano, le cellule simulate in Sentinel si muovono in base agli stimoli chimici che ricevono, alle loro capacità motorie e alle forze esterne che agiscono su di loro. Ciò garantisce che il movimento sia il più realistico possibile ed è una nuova funzionalità di Sentinel.

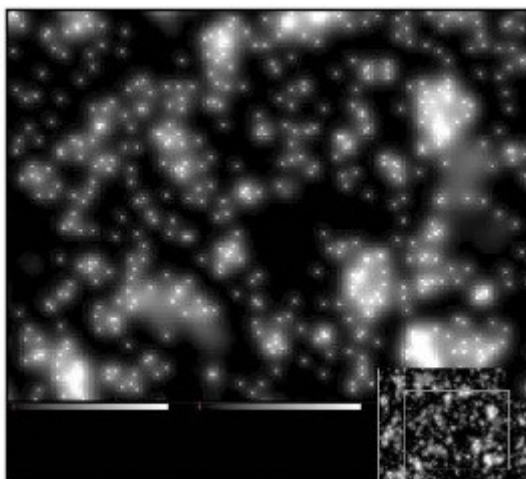
Un motore chimico è responsabile della gestione delle reazioni chimiche e biochimiche e della distribuzione di molecole extracellulari in tutto l'ambiente. Ad esempio, se una cellula rilascia un particolare tipo di citochina nella sua posizione, il motore chimico farà sì che quella citochina si disperda gradualmente attraverso l'ambiente (vedi Fig. 7b, che esemplifica una mappa di densità) per diffusione.

Questa caratteristica è essenziale per la simulazione accurata del movimento cellulare per chemiotassi (il processo mediante il quale le cellule immunitarie si muovono verso concentrazioni più elevate di fattori chemiotattici). Chiaramente, ciò consente anche a una sola cellula di influenzare una vasta estensione del suo ambiente rispetto a quella che sarebbe normalmente consentito negli automi cellulari, diffondendo la loro influenza oltre l'area immediatamente vicina.



**Fig. 7a. La struttura del sistema Sentinel. La figura principale mostra le diverse concentrazioni di sostanze chimiche in un ambito dettagliato dell'ambiente di simulazione. L'inserito mostra la posizione del dettaglio nell'intero spazio (environment).**

L'implementazione della chemiotassi è un'altra caratteristica innovativa di Sentinel.



**Fig. 7b. Sentinel simula la diffusione di sostanze chimiche per implementare la chemiotassi realistica e, soprattutto, per simulare gli effetti delle citochine (vedi testo).**

Le cellule in vivo sono in grado di rispondere a varie molecole chemiotattiche rilevando gradienti di densità e spostandosi verso la densità più alta o più bassa di quell'agente (Ramsay 1972). La dispersione delle molecole chemiotattiche in Sentinel viene calcolata per dispersione nel tempo alle locazioni circostanti. Una cellula nella simulazione è in grado di accedere ad otto posizioni vicine per analizzare le densità di molecole presenti dove sia più alta o più bassa. Può quindi utilizzare queste informazioni per spostarsi di conseguenza.

Dato un insieme di entità e sostanze chimiche (cellule B, anticorpi, cellule di memoria, citochine, ecc.), l'influenza dei motori di fisica e chimica è definita da un certo numero di regole. Queste regole definiscono quando un'entità può interagire con un'altra cellula e la natura di tale interazione; come una cellula rilascia sostanze chimiche o altre molecole nel suo ambiente circostante e altre svariate caratteristiche, come il flusso sanguigno che agisce su tutte le entità e/o sostanze chimiche. Dopo aver definito il modello di simulazione, scegliendo le entità, i prodotti chimici e le regole, il simulatore viene avviato e le informazioni vengono elaborate in base all'insieme di dati definiti dall'utente.

Questi dati possono essere visualizzati sotto forma di vari grafici e campioni o trasmessi a log file (file di lavoro o di elaborazione) per l'analisi, il tutto all'interno del sistema Sentinel. Sembra probabile che questa architettura di simulatore sia utile anche in altre aree, come la biochimica, la genetica, etc.

Il simulatore è completato da un sistema di sviluppo integrato (IDE), che fornisce una serie di potenti strumenti per il rapido sviluppo di nuovi modelli. Le interfacce grafiche drag-and-drop consentono all'utente di scegliere rapidamente gruppi di "agenti biologici" e stabilire i collegamenti tra di essi, nonché di configurare e connettere le aree dell'ambiente e descrivere le regole fisiche che opereranno al loro interno.

Un editor di codice consente agli utenti di sviluppare estensioni basate su Java per questi modelli di base, con l'assistenza di strumenti di generazione automatica del codice e una completa API (Application Programmers Interface) che fornisce funzioni generiche per la manipolazione degli agenti biologici e dell'ambiente. Per molti aspetti, il sistema è in qualche modo simile a piattaforme come Robocode<sub>6</sub> (<http://robocode.sourceforge.net>), ma molto più potente.

Sentinel può simulare diversi milioni di cellule, centinaia di milioni di anticorpi e le loro interazioni, su un tipico sistema di fascia alta. Sebbene questa cifra vari a seconda della complessità del modello, Sentinel sembra essere il simulatore più potente attualmente disponibile, specialmente in considerazione delle complesse interazioni che simula. La capacità di Sentinel di simulare la diffusione è molto importante dato che la segnalazione tramite citochine tra le cellule è una parte vitale dell'immunologia. In effetti, uno dei seguenti esperimenti non avrebbe potuto essere

implementato senza queste capacità.

## 4.2 Esperimenti e test con il simulatore Sentinel

**Test di validazione di Sentinel:** prima di utilizzare Sentinel per valutare la teoria di Bernasconi et al., abbiamo convalidato le sue prestazioni. I sistemi di validazione e di valutazione hanno lavorato con circa di  $10^8$  B-cellule. Abbiamo ripetuto gli esperimenti "Nessuno", "Memoria Emergente" e "Antigene Residuo", come nella sezione precedente, ma non abbiamo implementato la "Memoria Network" perché poco incisiva per i nostri obiettivi.

Implementando gli stessi test fatti nelle simulazioni di base, abbiamo voluto dimostrare che Sentinel avrebbe funzionato altrettanto bene quanto le precedenti simulazioni di base. Se i risultati fossero stati qualitativamente uguali, avremo dimostrato che Sentinel è in grado di riprodurre le performance precedenti. Ciascuna delle nostre simulazioni è stata eseguita dieci volte, al fine di garantire risultati costanti e coerenti.

**“Valutazione delle teorie” con Sentinel:** questo protocollo sperimentale è stato progettato per esplorare la veridicità della **“Memoria eterologa e policlonale”**, tramite simulatore, esperimento mai fatto prima. Non è stato possibile utilizzare il nostro strumento di simulazione di base perché l'esperimento richiedeva l'implementazione di un gradiente delle citochine (IL-15) e doveva essere eseguito su una scala molto più ampia per ottenere risultati significativi. Solo Sentinel poteva soddisfare questi requisiti.

La costruzione del modello di Bernasconi et al. è basata sulla teoria da loro descritte nel 2002.

Hanno costruito le loro teorie a seguito di esperimenti in vivo e hanno affermato che i risultati sperimentali forniscono prove convincenti di stimolazione “nell'ambiente circostante” di cellule B di memoria. La serie completa di risultati pubblicati in (Bernasconi et al. 2002) sono stati testati contro i dati delle nostre simulazioni, quindi il nostro scopo era di valutare se fossero state in grado di riprodurre i risultati osservati in vivo. Nonostante i nostri tentativi, il processo sopra descritto è abbastanza limitato e il lavoro di parametrizzare qualsiasi simulazione è complesso, quindi abbiamo potuto osservare con certezza soltanto le somiglianze qualitative tra i risultati di Bernasconi e quelli prodotti da Sentinel.

## 4.3 Ipotesi di lavoro

Nella costruzione di questi modelli Sentinel, sono state fatte alcune ipotesi. Queste sono rimaste coerenti attraverso tutte le simulazioni condotte.

**Repertorio:** il repertorio delle simulazioni di Sentinel comprendeva cellule B, anticorpi, antigene e una citochina. Era più complesso in termini di entità introdotte ed ha utilizzato anticorpi in più ordini di grandezza numerica, rispetto ai RISE delle Simulazioni di base.

**Cellule di memoria a vita più lunga:** le celle B di memoria vivono più a lungo delle loro equivalenti naive. In natura, una cellula B naive tende a vivere per circa 24 ore a meno che non riceva stimoli, a quel punto viene "salvata" e può continuare a vivere per alcuni mesi (Bernasconi et al. 2002). Questo si ripete nei nostri modelli..

**Legami semplificati:** come nelle simulazioni di base e per fornire le migliori prestazioni possibili, è stato utilizzato un meccanismo di legame semplificato. Un ceppo di antigeni è dato un numero compreso tra 0 e 20.000, che rimane costante in tutta la popolazione. A ogni nuova cellula B viene assegnato un numero casuale all'interno di tale intervallo e la presenza di legame immunologico viene misurata come la distanza tra i due numeri.

**Selezione clonale:** in risposta all'antigene, le cellule B subiscono la selezione clonale e l'ipermutazione, come descritto dalla teoria di Burnet del 1959. Le cellule che sono state clonate mantengono il valore intero di legame (vedi punto precedente) del genitore, mutato in proporzione inversa alla sua forza di legame.

**Repertorio Immunitario semplificato:** la simulazione consiste nell'insieme di cellule B, anticorpi e antigene, più una citochina di segnalazione. L'interazione tra le cellule T e le cellule B non viene

simulata in questi test, ma è pianificata (vedere ulteriori lavori). Avevamo bisogno di mantenere il modello il più simile possibile ad un nostro sistema precedente (nessuna plasmacellula) per rendere il processo di validazione il più significativo possibile.

#### 4.4 Risultati del modello Sentinel

##### Validazione dei risultati di Sentinel.

I risultati in Fig. 8 mostrano che Sentinel produce correttamente una risposta secondaria a un'infezione ripetuta dello stesso antigene, per entrambe le teorie della memoria. Inoltre, i risultati di Sentinel mostrano che il modello dell'**Antigene residuo** mantiene una popolazione notevolmente più alta di cellule di memoria e anticorpi - fino a circa  $10^6$  anticorpi prima della seconda infezione, rispetto all'ordine di  $10^1$  per gli altri modelli di memoria. Questo è coerente con le Simulazioni di Base che hanno mostrato che il modello dell'**Antigene residuo** aveva più anticorpi.

In entrambi i simulatori (Sentinel e di Base), i modelli della teoria della **Memoria emergente** conservano una buona memoria a breve termine, e in entrambi i simulatori abbiamo osservato che la memoria immagazzinata in questo modo scompare con la morte cellulare. A meno che non si accetti che la risposta immunitaria primaria produce cellule di memoria quasi perenni, tali modelli produrranno sempre una memoria immunitaria che si attenua nel tempo.

Il modello della teoria dell'**Antigene residuo** sostiene un livello stabile di cellule di memoria in entrambi i simulatori (Sentinel e di Base) ed è stato in grado di produrre una risposta secondaria sostanziale indipendentemente dal periodo di tempo tra la prima e la successiva reinfezione. Sembra essere un modello vitale di memoria immunitaria; tuttavia, sembra improbabile che i requisiti per sostenere tale sistema siano soddisfatti in natura, poiché il sistema immunitario dovrebbe sostenere una produzione cellulare per un periodo molto lungo. In effetti questo punto è stato discusso diversi anni fa ([Matzinger 1994a](#)).

Sebbene ci siano alcune differenze nei dettagli, come il picco secondario più pronunciato nella risposta secondaria, consideriamo i due simulatori abbastanza simili da procedere con il confronto qualitativo dei risultati in vivo e con il computer.

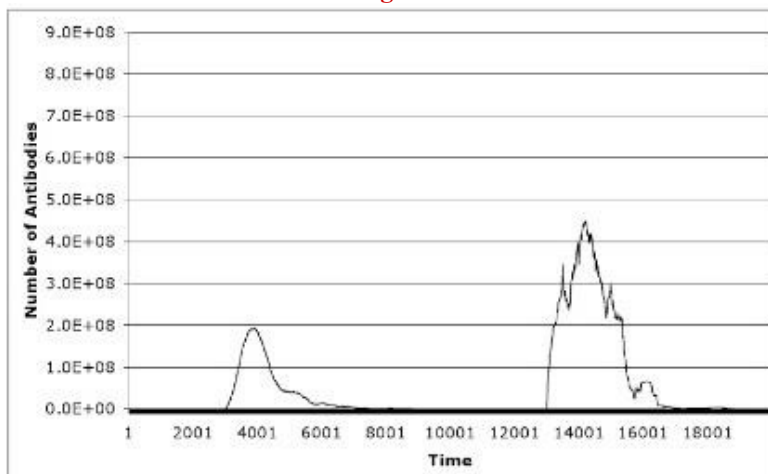
Un vantaggio di Sentinel è che possiamo distinguere le risposte secondarie delle varie teorie: (8a) il modello "*Memoria emergente-Preserveron*" ha una risposta ampia, ma non fa produrre così tanti anticorpi, e la risposta secondaria è bassa, e (8b) il modello "*dell'antigene residuo*" ha una risposta secondaria acuta, di media altezza, con una coda molto estesa, decrescente in modo esponenziale.

I nostri precedenti esperimenti erano troppo grezzi per fornire risultati che presentavano differenze significative e le curve che producevano erano un tipo di esponenziale quasi perfetto seguito da una diminuzione esponenziale più lenta e anch'essa quasi perfetta.

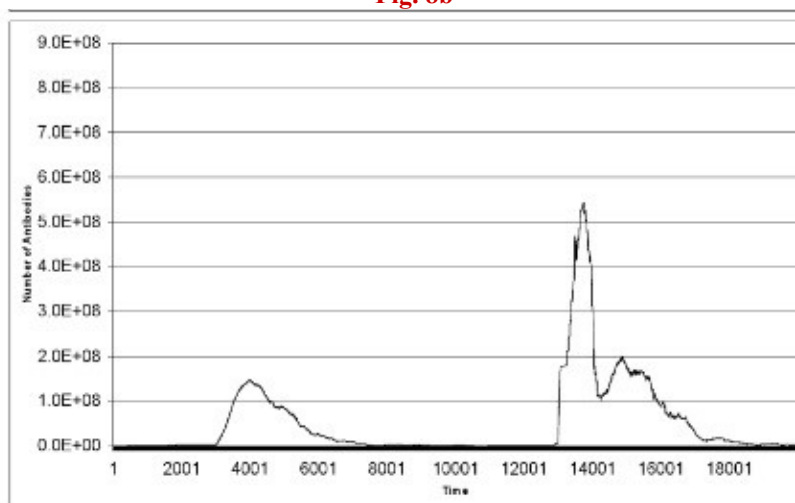
È interessante notare che c'è una leggera "oscillazione" alla fine del decremento esponenziale, che è presente anche nella risposta secondaria (vedi grafici di Fig. 8). Questi esperimenti mostrano che siamo in grado di riprodurre i risultati delle precedenti Simulazioni di Base, con una risoluzione migliore.

(seguono i grafici di fig. 8)

**Fig. 8a**



**Fig. 8b**



**Fig. 8)** Grafici di validazione prodotti con il programma Sentinel per misurare la quota anticorpale misurata in un tempo arbitrario (ascissa). a) teoria della memoria emergente “preserveron”, b) teoria dell’antigene residuo. L’antigene viene inoculato al T teorico=3000 e reinoculato per la risposta anamnesticca al T=13000.



### Risultati di Sentinel sulla "Valutazione delle teorie della memoria immunitaria"

Poiché nella sottosezione "Esperimenti e test" abbiamo dichiarato di non avere convalidato gli elementi su scala più ampia (cioè meno approssimata) delle elaborazioni di Sentinel, confronteremo i risultati, in modo qualitativo. La Fig. 9 mostra due grafici di Sentinel - ciascuno con diversi parametri del modello "Memoria eterologa e policlonale" - e una presentazione del grafico dei risultati sperimentali "in vivo" di (Bernasconi et al. 2002).

Fig. 9

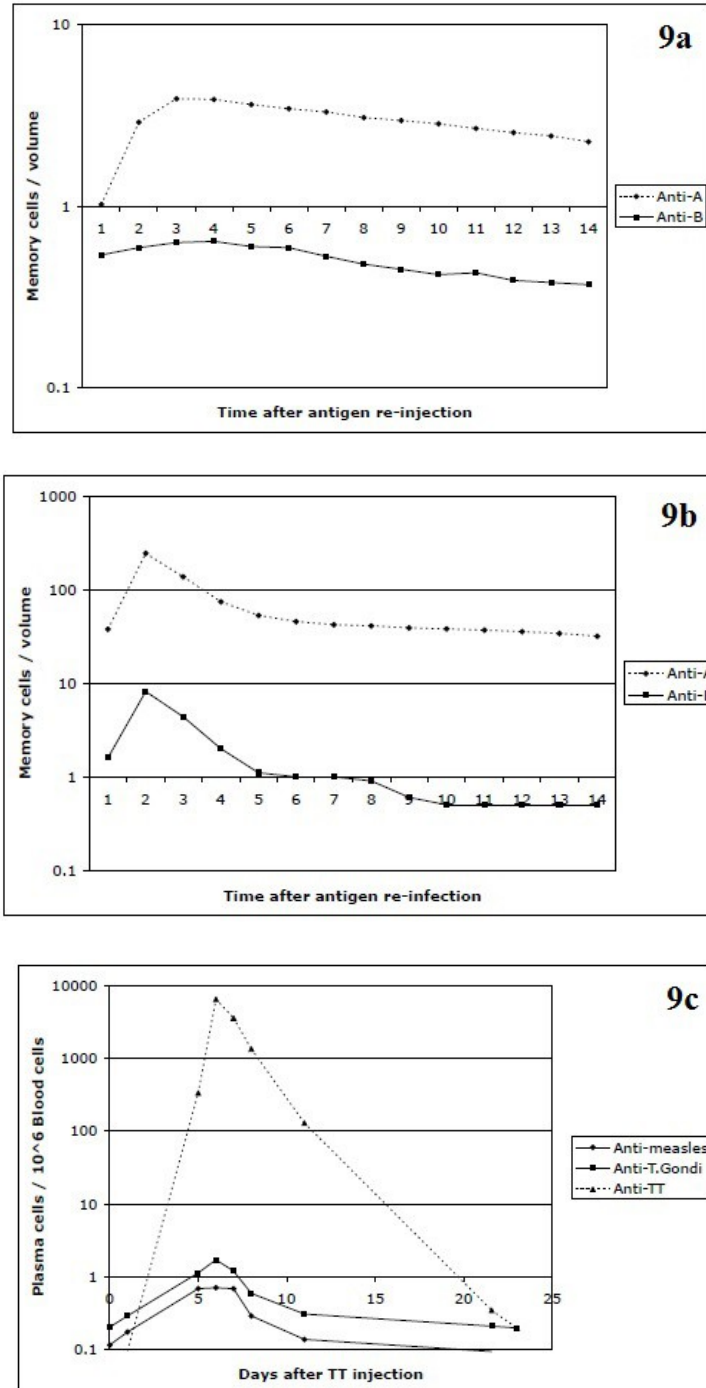


Fig. 9. (9a, 9b) Diagrammi del livello di cellule di memoria per volume per due antigeni, A e B, che sono troppo diversi per causare direttamente una risposta reciproca. Il sistema immunitario è già stato esposto a entrambi gli antigeni A e B. L'antigene A viene reintrodotta a  $t = 0$ . (9a) e (9b) sono per due diverse parametrizzazioni del modello (vedi testo). Entrambi i casi mostrano un aumento inaspettato delle cellule di memoria specifiche dell'antigene B non iniettato. Poiché i livelli delle plasmacellule sono approssimativamente in proporzione lineare rispetto alle concentrazioni delle cellule di memoria, i risultati simulati sono qualitativamente coerenti con i risultati in vivo di Bernasconi (9c = aumento di antimeasles e antitossina dopo inoculazione di antiTT [antitossina tetanica]).

Si noti che il grafico Anti-A, causato dall'antigene re-inoculato A, in 9a (in alto) e 9b (in mezzo) ha un picco meno profondo rispetto al grafico di Anti-TT nel grafico 9c in basso. I valori dei parametri per il grafico 9a (superiore) danno risultati inferiori a 9b, se analizziamo i punti relativi all'indice temporale da 1 a 5. La necessità di trovare una buona parametrizzazione è discussa nella successiva sezione "Future prospettive di sperimentazione". Le scelte parametriche determinano alcune caratteristiche del grafico di Bernasconi et al., ma le relative pendenze sembrano indicare che c'è un certo grado di corrispondenza tra i risultati simulati in (9b) e quelli in vivo (9c).

Sebbene non perfettamente confermata, una simulazione della teoria di Bernasconi et al. ha dimostrato di essere qualitativamente somigliante, rispetto alle misurazioni in vivo.

Ma cosa causa le differenze quantitative? Le disparità possono essere dovute a:

1. modellazione errata della teoria di Bernasconi et al;
2. mancanza di dettagli nel modello;
3. errata parametrizzazione di quel modello;
4. una teoria fondamentalmente errata alla base del modello.

Il prossimo passo è identificare la causa delle disparità. Il primo e l'ultimo di questi punti possono essere affrontati aprendo un dialogo con il gruppo di Bernasconi, ma i punti (2) e (3) richiederanno un ulteriore lavoro significativo, come descritto di seguito.

In conclusione, la simulazione della *teoria dell'attivazione policlonale* ha prodotto risultati interessanti, simili a quelli ottenuti dalla *teoria dell'antigene residuo*, ma senza richiedere una presenza di antigene a lungo termine. Gli stimoli forniti da IL-15 sembrano essere essenziali per questo fenomeno. Sembra coerente e naturale che vi sia un contatto costante dell'antigene per rinnovare la memoria, ed è stato dimostrato un effetto di *memoria policlonale* qualitativamente simile alle osservazioni sperimentali di Bernasconi et al. 2002.

### **Future prospettive di sperimentazione**

L'estensione logica del nostro modello di base della memoria policlonale è di creare successivamente un modello B-cell / T-cell e APC (antigen presenting cell) più dettagliato, e quindi usarlo come standard per un modello combinato che tenta di simulare le ultime teorie sulle cellule B- e T di Memoria. Una volta che questo modello è stato implementato, possiamo iniziare a indagare specificamente la relazione tra memoria dei linfociti B e T, e scoprire nuove regole per la maturazione in plasmacellule, cellule di memoria ed omeostasi delle suddette popolazioni.

Come accennato in precedenza, il livello di dettaglio di una simulazione dovrebbe essere il più semplice possibile, ma una simulazione troppo semplice non sarà altrettanto efficace. Questo è un dilemma standard della generazione di ipotesi sull'apprendimento artificiale (machine learning) e intendiamo risolvere questo problema mediante un feedback automatico. In altre parole, genereremo un folto gruppo di simulazioni e quindi le miglioreremo per trovare il modello più semplice e più efficace.

Se la scelta dei parametri per qualsiasi modello è un problema (Ljung 1999), la progettazione del modello è molto più complicata (King et al. 2005). Stiamo esaminando diversi metodi di parametrizzazione assistita dei modelli, in modo che Sentinel possa trovare "il più adatto".

Ciò consentirà alla ricerca di concentrarsi sul compito di elaborazione di un modello scientificamente interessante, piuttosto che sul compito più meccanico di parametrizzazione, e aiuterà a rimuovere alcune delle differenze tra i risultati informatici e quelli in vivo enunciati nella sezione precedente.

Uno dei nostri obiettivi a lungo termine è quello di produrre un modello integrato di memoria immunologica che spieghi le prove sperimentali utilizzate per supportare molte, se non tutte, le teorie esplorate qui. Un tale modello potrebbe essere utilizzato per esplorare questioni più dettagliate nella memoria immunologica, come gli effetti insoliti del gene SAP (che controlla la memoria a lungo termine, ma non ha alcun effetto sulla memoria a breve termine) (Crotty et al. 2003).

Inoltre, una teoria generale della memoria immunologica avrebbe implicazioni per l'apprendimento in automazione (machine learning).



Le applicazioni fin qui descritte sono esclusivamente legate all'immunologia, e in effetti questo è l'obiettivo principale del lavoro. Ciononostante, la nostra piattaforma Sentinel sarà probabilmente utile negli sforzi dell' AIS in futuro, in particolare quando si tratta di comprendere le dinamiche degli algoritmi AIS basati su sistemi complessi con svariati parametri in azione.

Inoltre, la simulazione di nuove teorie immunologiche implementate in futuro dai ricercatori AIS potrà fornire suggerimenti nel determinare l'insieme minimo di caratteristiche richieste nello sviluppo di una rappresentazione astratta dei meccanismi immunitari.

Il successivo sviluppo di Sentinel, potrà permettere l'elaborazione di modelli più grandi e più complessi di quelli attuali. Sarà interessante osservare se l'aumento della complessità è importante o se esiste un livello di complessità sufficiente per la maggior parte della ricerca immunologica.

