

Immunologia dei trapianti

Con il termine trapianto ci si riferisce a interventi chirurgici che salvano la vita. Il trapianto viene utilizzato per correggere un deficit funzionale del ricevente.

Il trapianto è la procedura che prevede il prelievo di cellule, tessuti, organi da un individuo ed il reinserimento in un individuo solitamente diverso. Il trapianto è il trattamento più indicato per gravi disturbi di cuore, polmone, rene, fegato e del sistema ematopoietico. Il trapianto è di organo solido nel caso di cuore, polmone, rene, fegato, di tessuto nel caso di trapianto di midollo o di cellule emopoietiche.

Il soggetto che fornisce il tessuto da trapiantare rappresenta il donatore mentre quello che lo riceve è il ricevente.

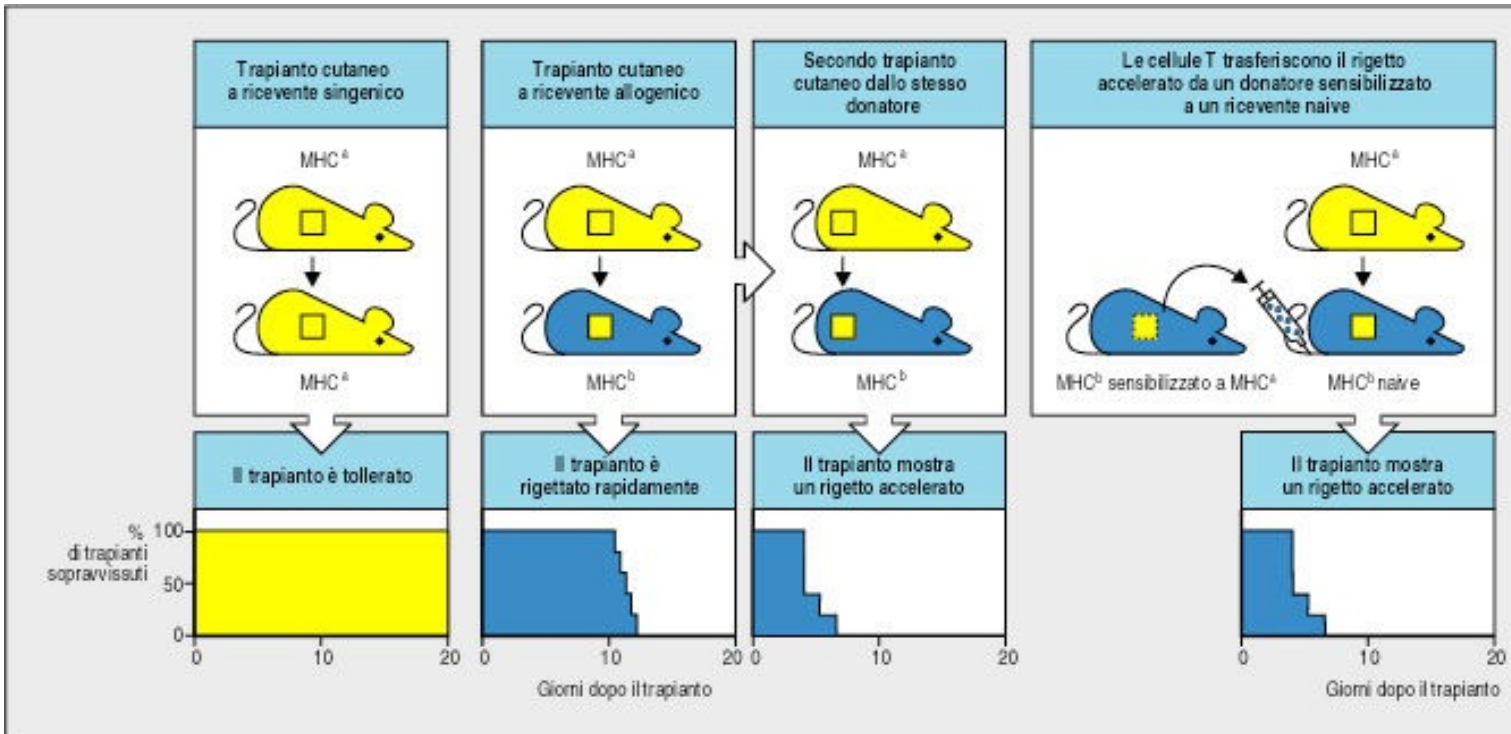
Trapianto fra due individui geneticamente identici: trapianto singenico

Trapianto fra due individui geneticamente diversi: trapianto allogenico

Trapianto fra due individui di diversa specie: trapianto xenogenico

Trapianto all'interno dello stesso individuo: trapianto autologo

Il trapianto tra individui geneticamente diversi induce il rigetto

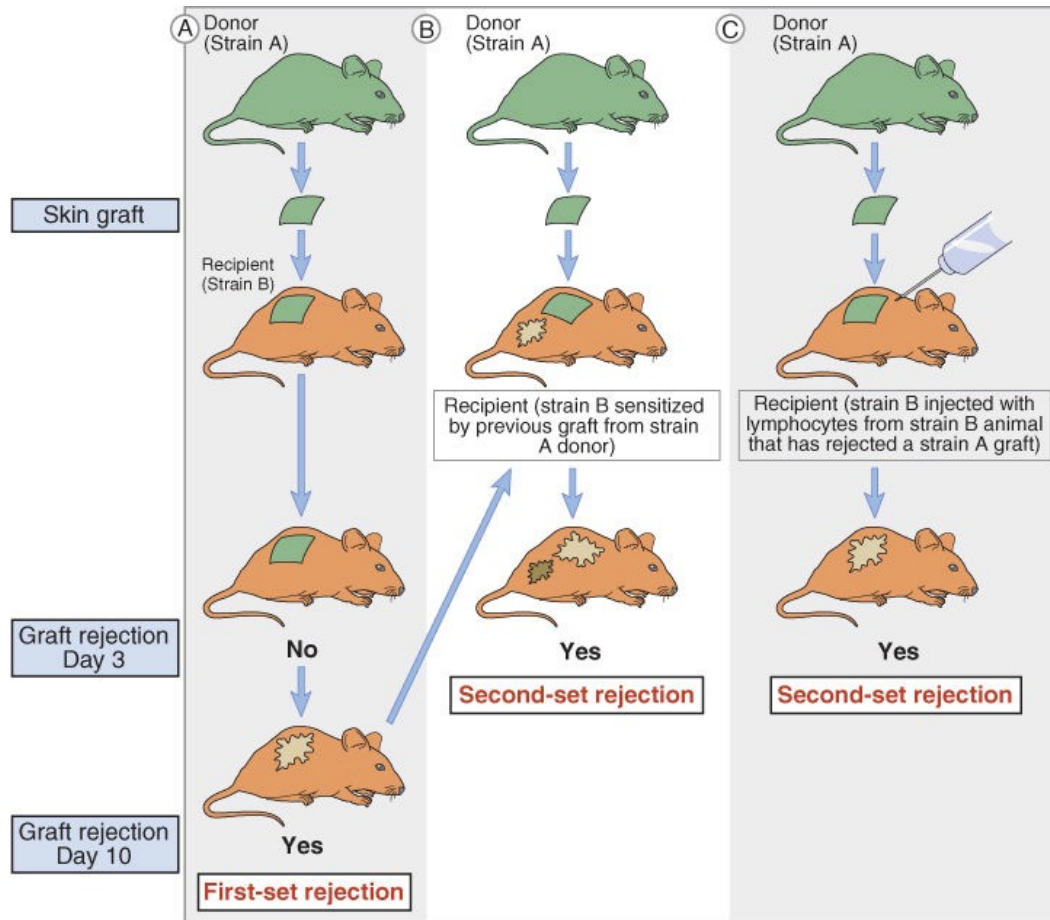


Il rigetto del trapianto rappresenta il principale ostacolo al successo dei trapianti. Questo problema si è presentato sin dai primi tentativi di sostituire la pelle di individui ustionati. Il primo a descrivere il fenomeno del rigetto del trapianto fu Earl C. Padgett nel 1932 che osservò che il trapianto di pelle da donatori casuali non sopravviveva.

Topi imbred o singenici = topi con identiche sequenze nucleotidiche in ogni locus cromosomico.

Topi congenici= topi con identiche sequenze nucleotidiche in tutti i loci cromosomici tranne uno.

Il rigetto del trapianto presenta le caratteristiche tipiche delle risposte immuni.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Medawar studiando l'attecchimento di trapianti di pelle dimostra che mentre gli individui che erano stati sottoposti ad autotrapianto accettavano il tessuto, gli individui sottoposti ad allotrapianto lo rigettavano (1943).

Esperimenti di trapianto di cute su topi di ceppo diverso, Il trapianto viene rigettato in 7-10g.

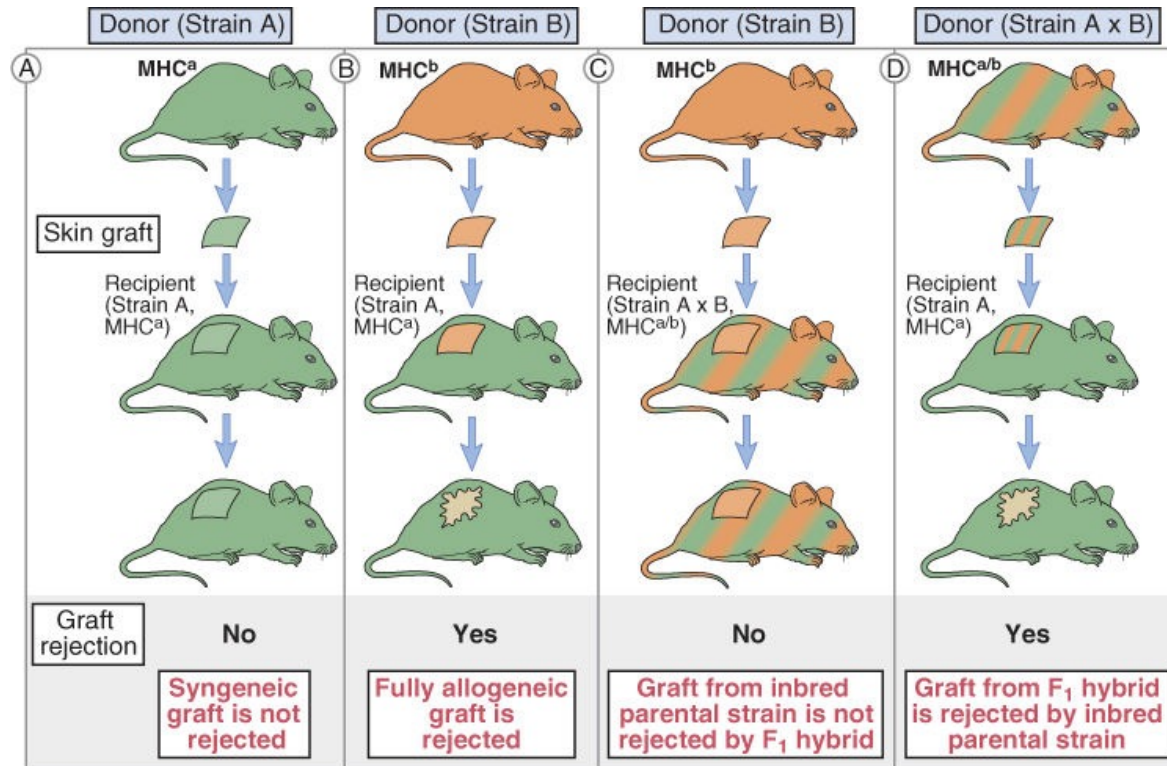
Rigetto primario

Un secondo trapianto dallo stesso donatore nello stesso ricevente viene rigettato nel giro di tre giorni. Rigetto secondario.

L'evidenza che il rigetto del trapianto è specifico e ha una memoria dimostra il coinvolgimento della risposta immunitaria adattativa in tale processo.

La capacità di montare un rigetto secondario contro il trapianto di cute può essere ottenuta trasferendo in un topo di ceppo B i linfociti T di un topo di ceppo B che ha già ricevuto un trapianto da un topo di ceppo A (Mitchison 1954).

Il riconoscimento delle cellule trapiantate è condizionato da geni polimorfi ereditati da entrambi i genitori ed espressi in modo codominante.

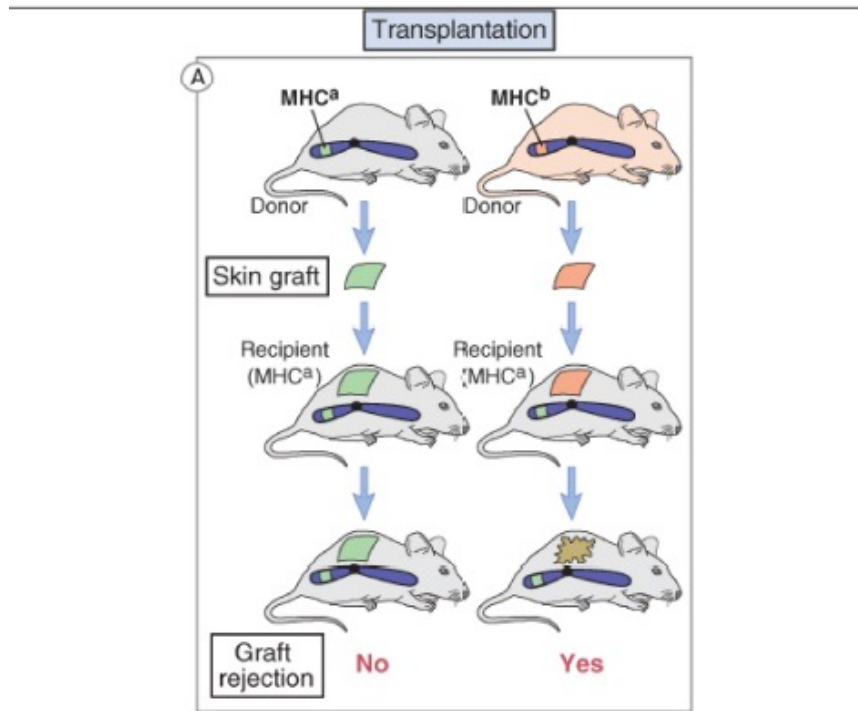


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Esperimenti di trapianto di cute fra ceppi di topi consanguinei e fra genitori e la prole di due diversi ceppi hanno dimostrato che:

- Organi trapiantati fra due animali identici non sono rigettati.
- Organi trapiantati fra due animali geneticamente diversi sono rigettati.
- La prole derivante dall'incrocio di due animali di ceppo diverso non rigetta trapianti provenienti da i due genitori.
- Le molecole responsabili della reazione di rigetto sono polimorfe e sono codominanti.

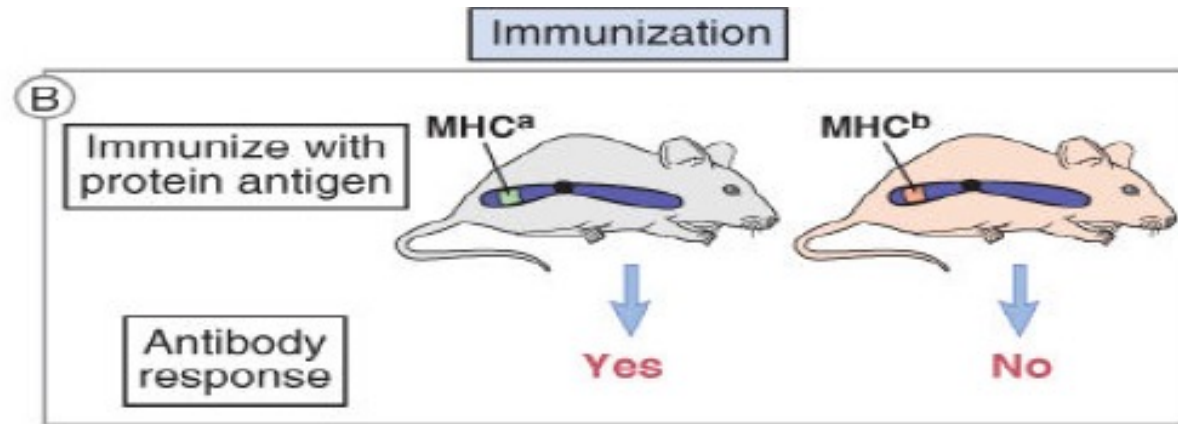
Identificazione del locus maggiore di Istocompatibilità come regione genica responsabile del rigetto del trapianto



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

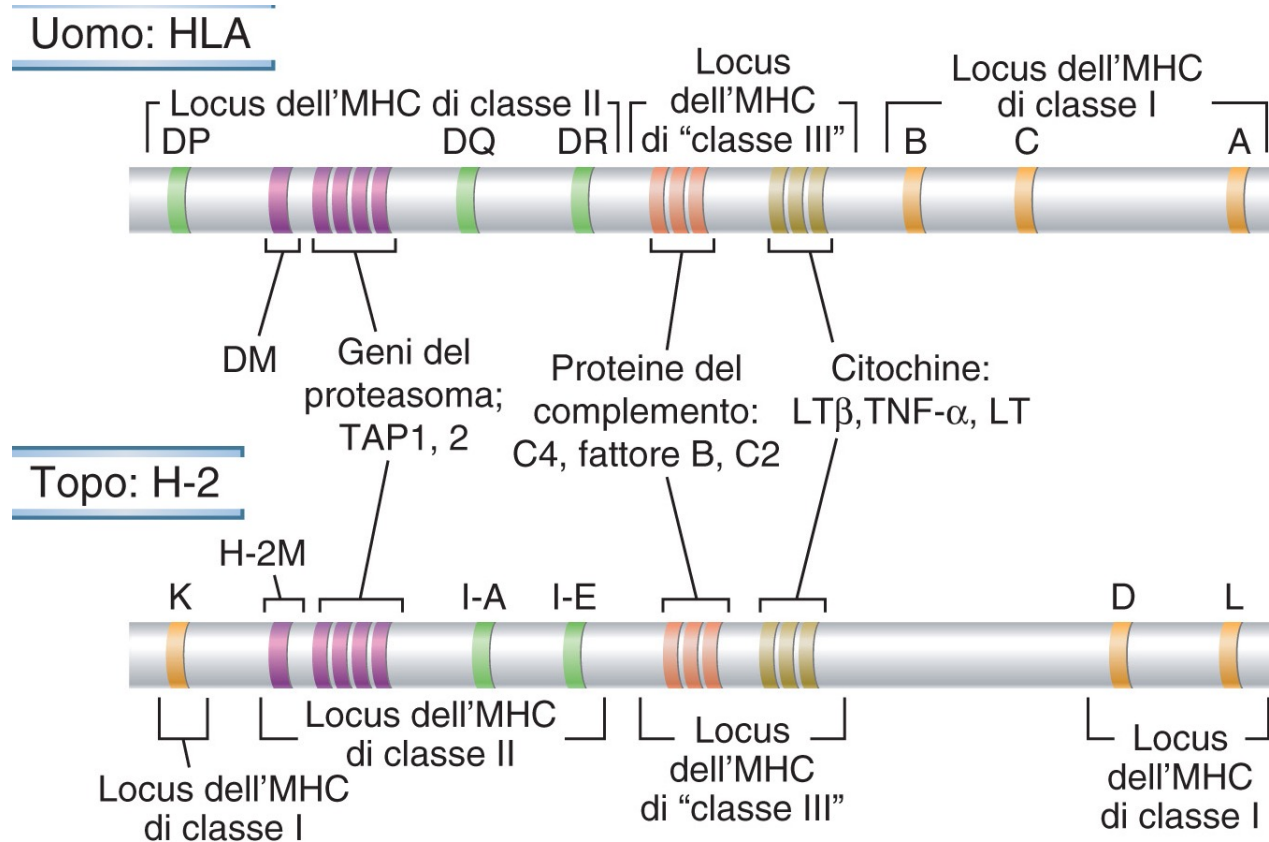
Generando ceppi congenici di topi che rigettavano i trapianti, Snell e collaboratori identificano il locus maggiore di istocompatibilità come il locus genetico responsabile del rigetto del trapianto (anni '50). La regione genetica che controllava il rigetto del trapianto e conteneva diversi geni venne definita Major Histocompatibility complex (MHC).

I geni del maggior Complesso di Istocompatibilità sono fondamentali in tutte le risposte immunitarie



B. Benacerraf e H McDavitt studiando la risposta anticorpale di ceppi di topi congenici identifica i geni della risposta immunitaria e li mappa nell'MHC (anni '70).

Mappa dei loci dell'MHC

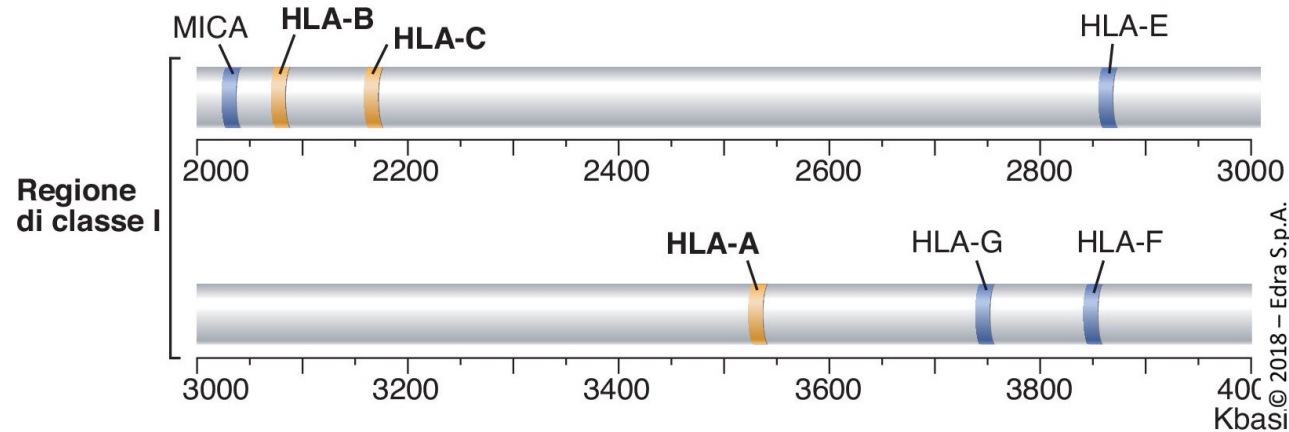


Il locus MHC presenta due tipi di geni polimorfi (classe I e classe II). Le molecole MHC di classe I e II sono strutturalmente distinte e entrambe sono coinvolte nella presentazione dell'antigene. Le molecole MHC di classe I e II presentano gli antigeni ai linfociti T $CD8+$ e $CD4+$ rispettivamente.

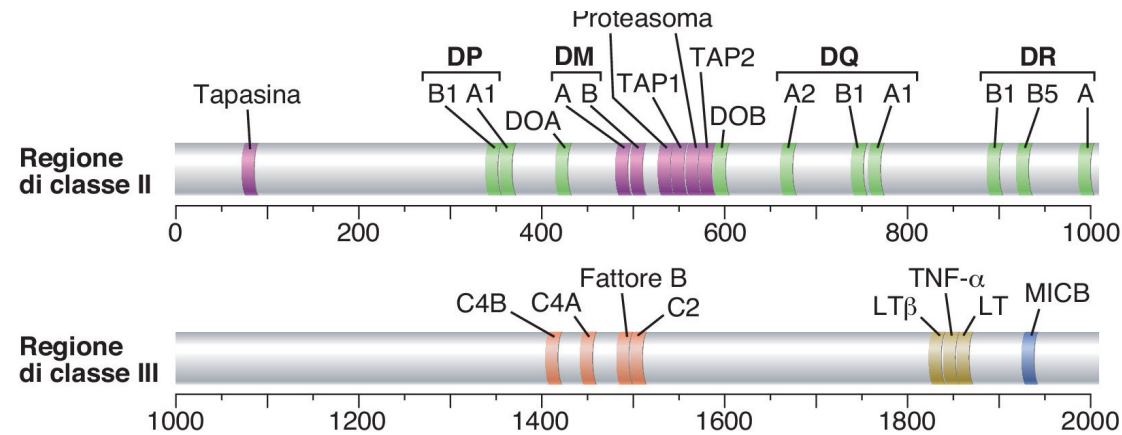
Molecole MHC di classe I

I geni MHC di classe I sono 3 e sono denominati HLA-A, -B, -C. Queste molecole sono costituite da una catena α e una catena invariante definita β_2 -microglobulina (gene localizzato sul crom.15).

Le molecole HLA di classe I sono espresse costitutivamente su quasi tutte le cellule nucleate.



Molecole MHC di classe II

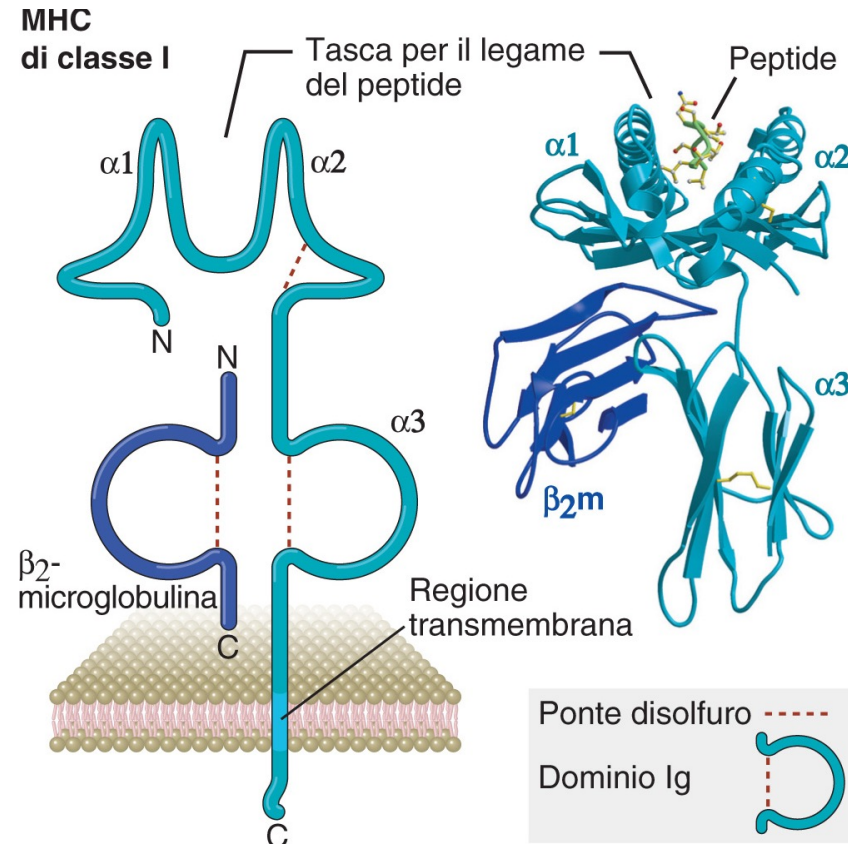


All'interno del locus dell'MHC di classe II sono presenti i geni codificanti le catene α e β che costituiscono le molecole HLA di classe II. Tali molecole sono il DP, DQ e il DR.

I loci DP, DQ e DR contengono geni distinti che codificano per la catena α e β .

Le molecole HLA di classe II sono espresse costitutivamente dalle DC, dai macrofagi e dai linfociti B.

Molecole MHC di classe I



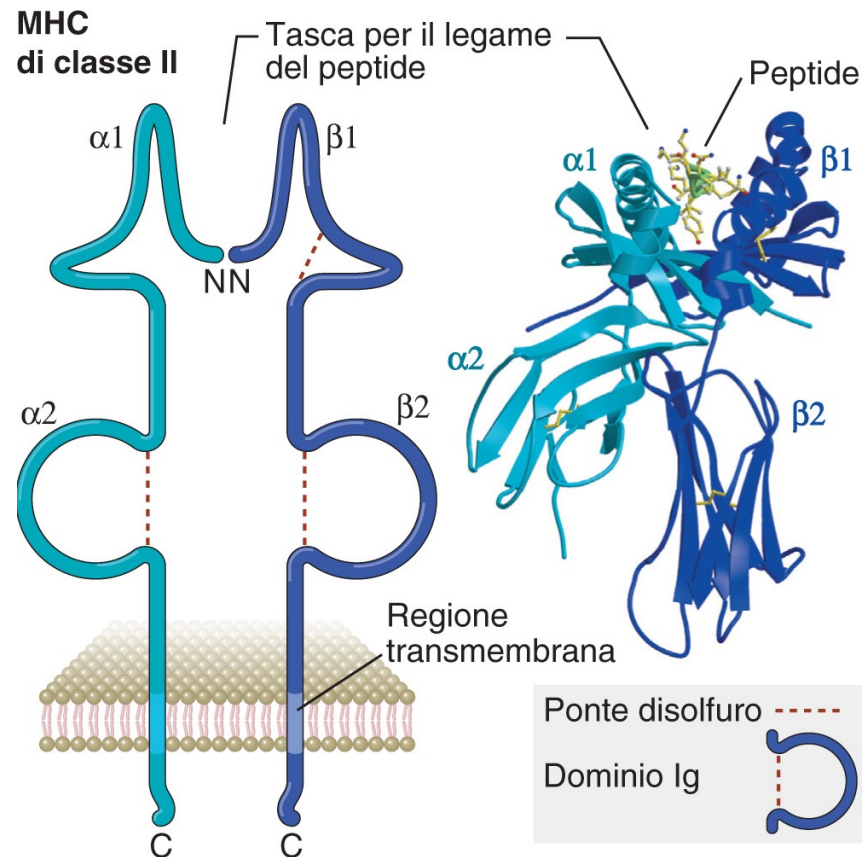
Le molecole MHC di classe I sono costituite da due catene polipeptidiche non legate covalentemente: la catena α e la β_2 -microglobulina. Nella catena α i domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formano la tasca di legame con il peptide costituita da un pavimento a foglietto β di otto filamenti antiparalleli e due pareti ad α -elica. La tasca è capace di legare peptidi di 9-11aa.

Il dominio $\alpha 3$ è conservato in tutte le molecole di classe I e contiene una regione che lega il corecettore CD8.

La molecola MHC completamente assemblata presenta un peptide legato alla sua tasca.

La presenza del peptide autologo o antigenico stabilizza le molecole MHC di classe I sulla membrana.

Molecole MHC di classe II



I segmenti N-terminali $\alpha 1$ e $\beta 1$ delle catene delle molecole di classe II interagiscono fra loro per formare la tasca di legame con il peptide.

4 nastri che compongono il pavimento e 1 α -elica sono formati da $\alpha 1$, gli altri 4 nastri del pavimento e l'altra α -elica sono formati da $\beta 1$.

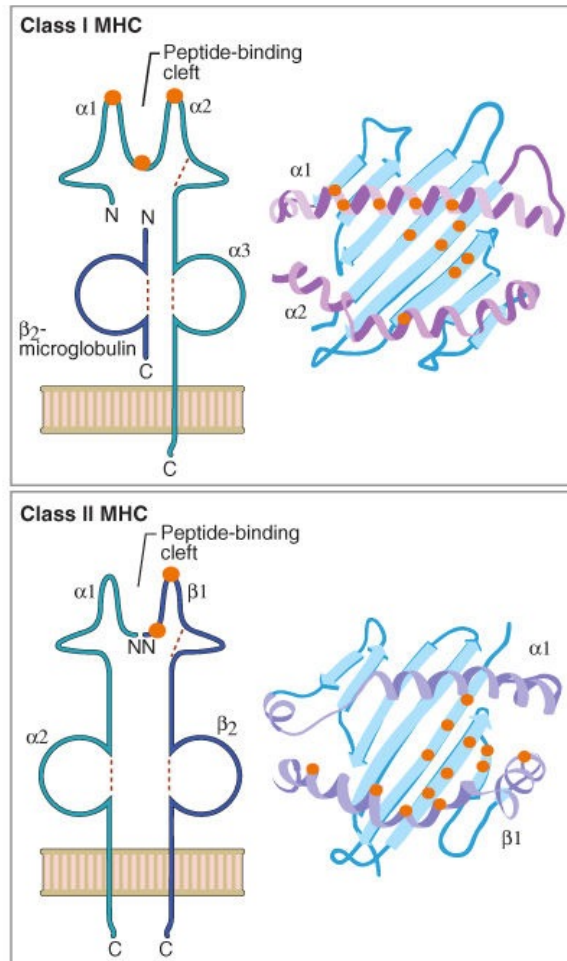
I residui polimorfi sono localizzati nelle regioni $\alpha 1$ e $\beta 1$ e nell'uomo il polimorfismo maggiore si ha nella catena β .

I segmenti $\alpha 2$ e $\beta 2$ non sono polimorfi. Un segmento della regione $\beta 2$ è responsabile dell'interazione con il CD4.

Le molecole MHC di classe II legano peptidi di 15-30aa.

La molecola MHC completamente assemblata presenta un peptide legato alla sua tasca

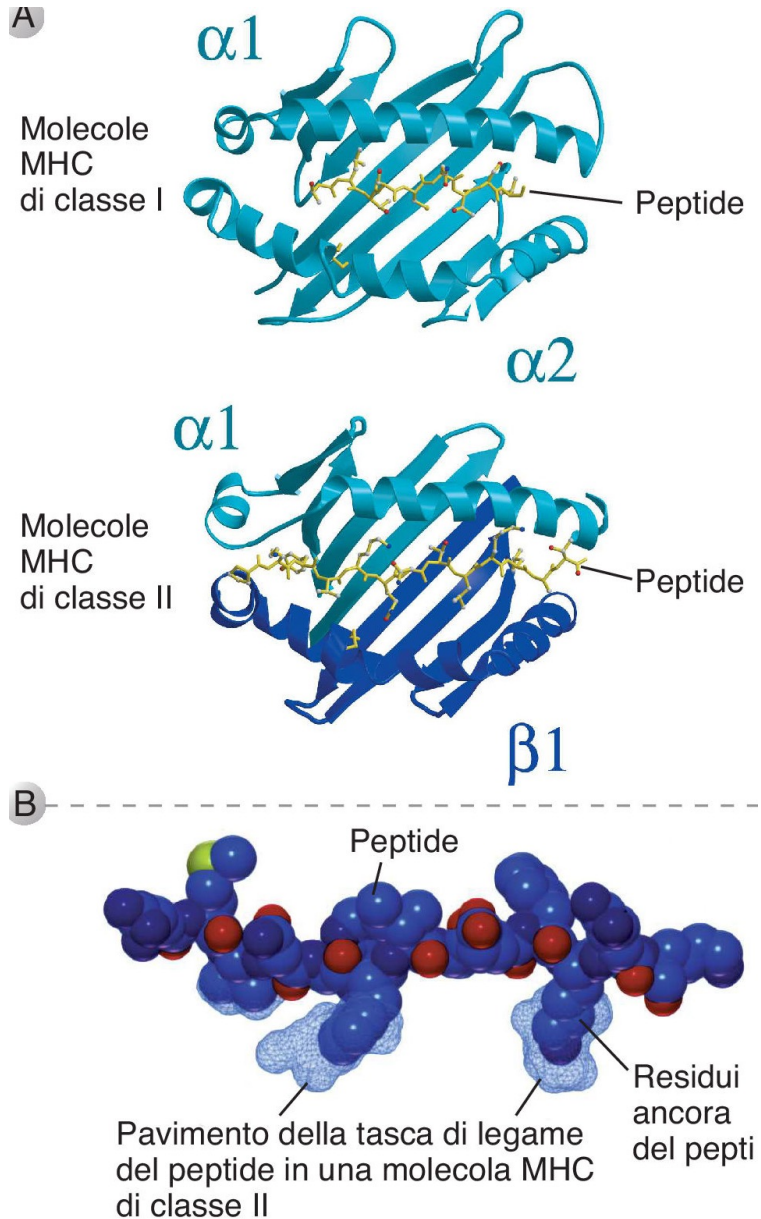
Molecole MHC di classe I e II



Le molecole MHC sono altamente polimorfiche. Ciascun gene presenta molti alleli

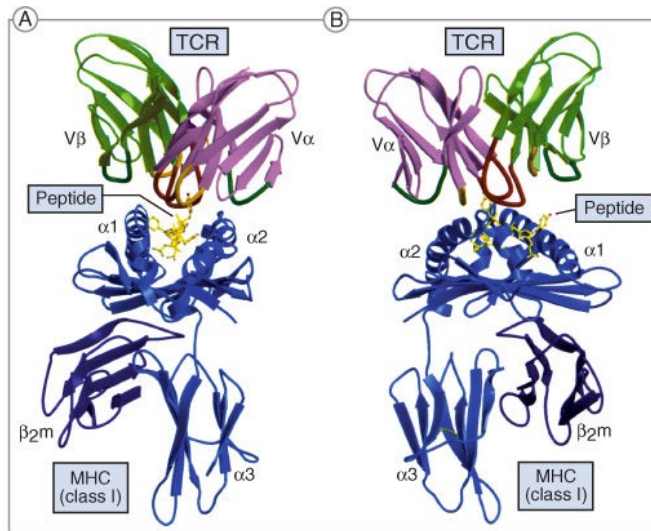
- Ogni molecola MHC contiene una vera e propria tasca a cui si legano i peptidi da presentare ai linfociti T.
- I residui aminoacidici polimorfi delle molecole MHC sono situati all'interno e nelle vicinanze della tasca di legame per il peptide
- Le regioni non polimorfiche contengono siti di legame per i recettori CD4 e CD8.

Basi strutturali del legame dei peptidi alle molecole MHC

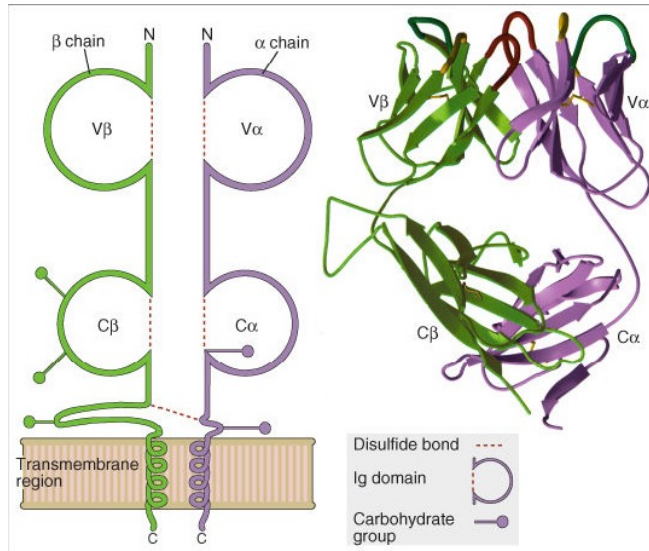
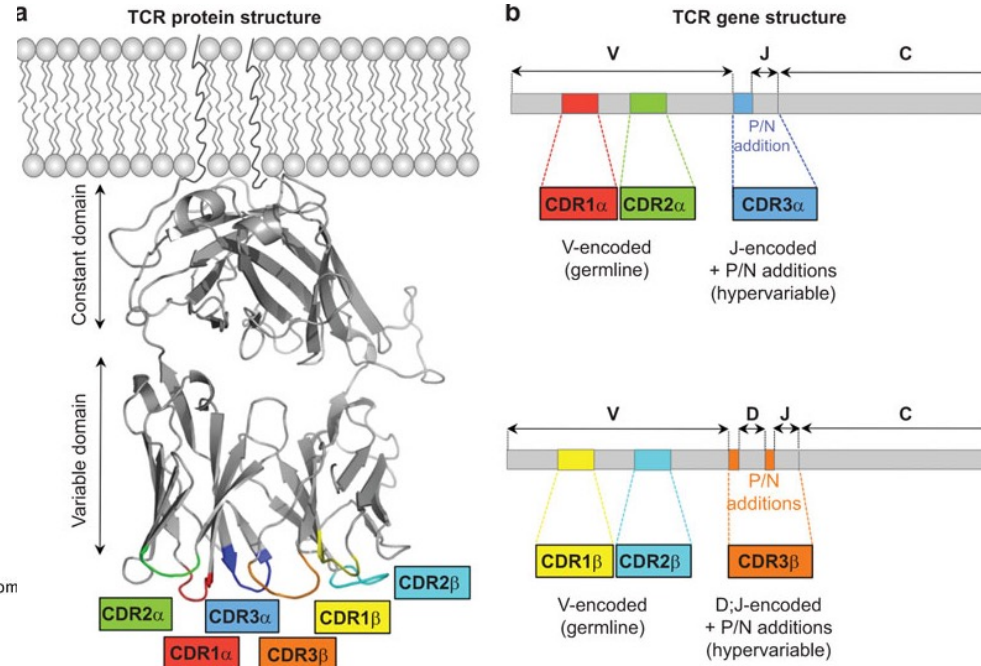


- Il legame dei peptidi alle molecole MHC è una interazione non covalente tra residui presenti nel peptide e nella tasca MHC.
- Il foglietto β del pavimento della tasca forma nicchie a cui si adattano le catene laterali dei residui aminoacidici del peptide. Per esempio molte molecole MHC di classe I possiedono una nicchia idrofobica in cui si posiziona un aminoacido idrofobico all'estremità COOH del peptide. Questi residui aa prendono il nome di residui ancora.
- Molti dei residui all'interno o in prossimità della tasca delle molecole MHC sono polimorfi facendo sì che differenti alleli leghino peptidi diversi.
- Una porzione del peptide legato rimane esposta all'imboccatura della tasca della molecola MHC e le catene laterali degli aa di questa porzione sono riconosciute dal TCR

Interazione TCR-MHC+peptide

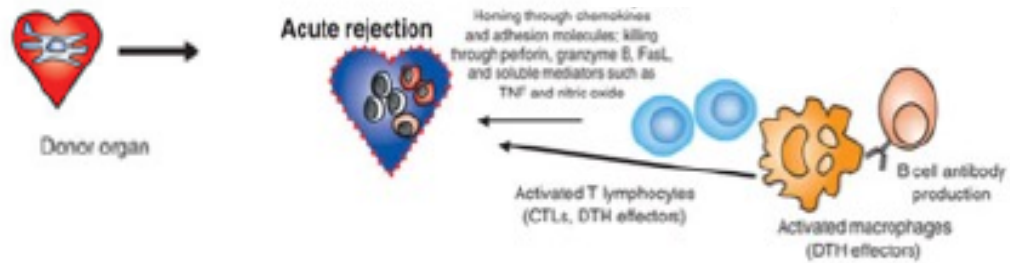


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

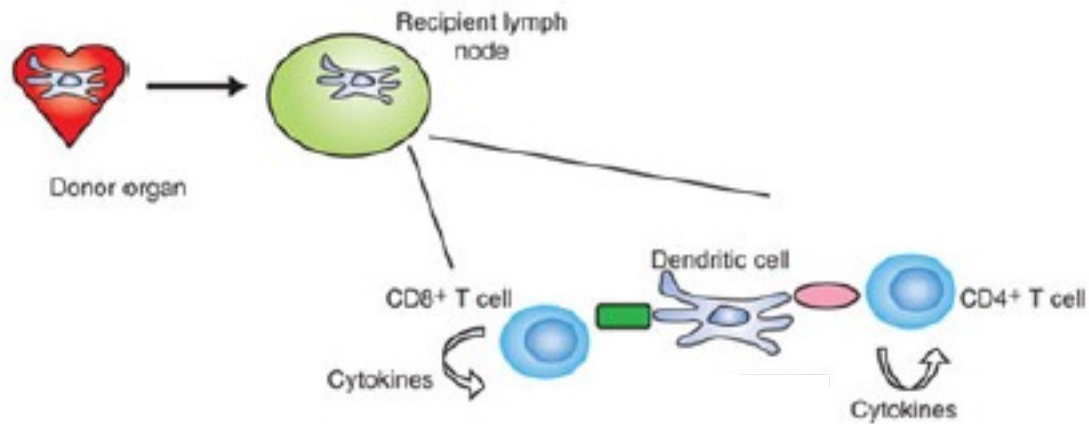


Nel riconoscimento classico il sito di legame del complesso MHC+peptide da parte del TCR è una superficie planare formata dalle CDR (complementarity determining regions) della catena α e della catena β del TCR. Il CDR1 e il CDR2 contattano l'MHC il CDR3 il peptide.

Il rigetto del trapianto è mediato dai linfociti T specifici per molecole MHC alloreattive

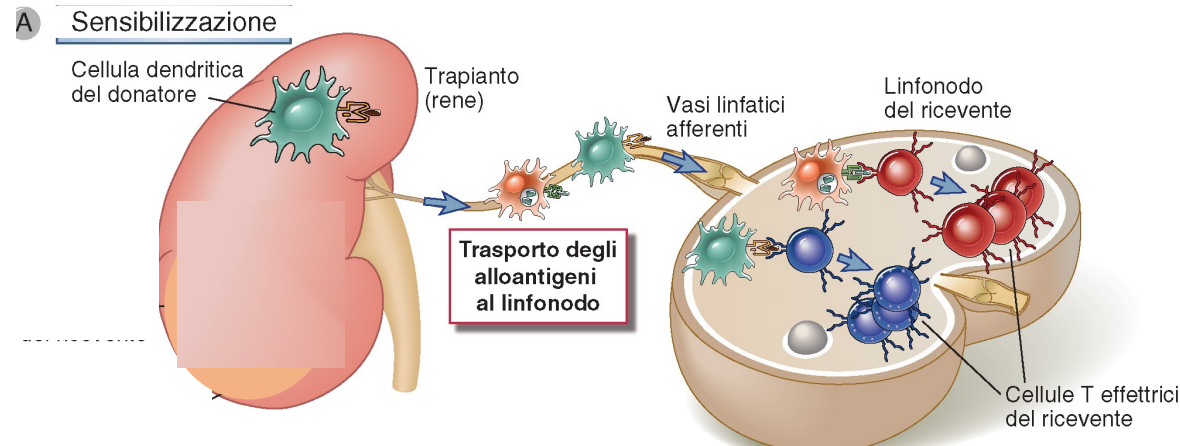


I linfociti T alloreattivi mediano il danno vascolare e parenchimale dell'organo trapiantato. I linfociti T possono riconoscere le molecole MHC allogene intatte (riconoscimento diretto) o sotto forma di peptidi associati alle molecole MHC autologhe



L'attivazione dei linfociti T alloreattivi avviene negli organi linfoidi secondari attraverso la presentazione diretta, indiretta o semidiretta delle molecole MHC del donatore.

L'induzione (priming) delle risposte alloreattive avviene nei linfonodi da parte delle cellule dendritiche del donatore o del ricevente



Evidenza che le APC (antigen presenting cells) sono presenti nei linfonodi del ricevente.

L'attivazione delle risposte T alloreattive e il rigetto del trapianto non avvengono negli animali che mancano di organi linfoidi secondari

La sensibilizzazione agli alloantigeni presentati dalle cellule dendritiche avviene nei linfonodi

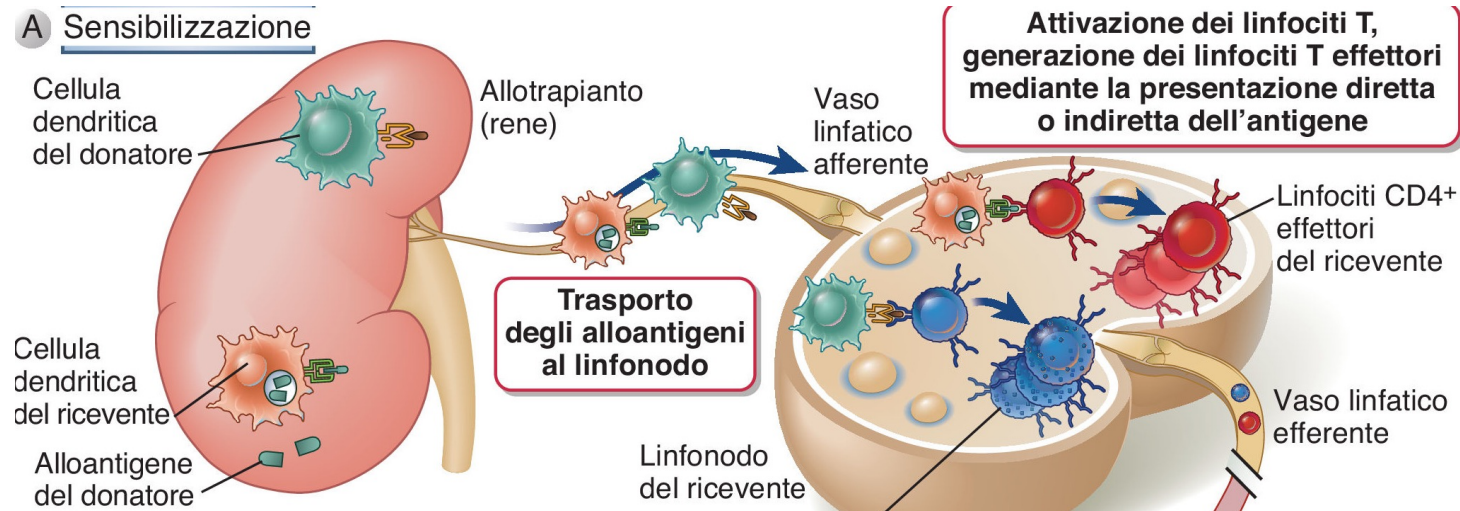
Storicamente le DC del donatore sono state considerate le principali antigen presenting cells responsabili dell'attivazione dei linfociti T alloreattivi.

L'organo da trapiantare (tiroide o dell'ovaio) se mantenuto in coltura per diversi giorni o depletato dei leucociti prima di essere trapiantato perde la capacità di indurre il rigetto. Ipotesi: il rigetto del trapianto richiede la presenza di cellule presentanti l'antigene del donatore.

Esperimenti di trasferimento di linfociti T, linfociti B, macrofagi o cellule DC singenici con il donatore al momento del trapianto hanno dimostrato che il trasferimento di queste ultime si associa a rigetto del trapianto.

Direct pathway of alloantigen presentation.

L'induzione (priming) delle risposte alloreattive avviene nei linfonodi da parte delle cellule dendritiche del donatore o del ricevente

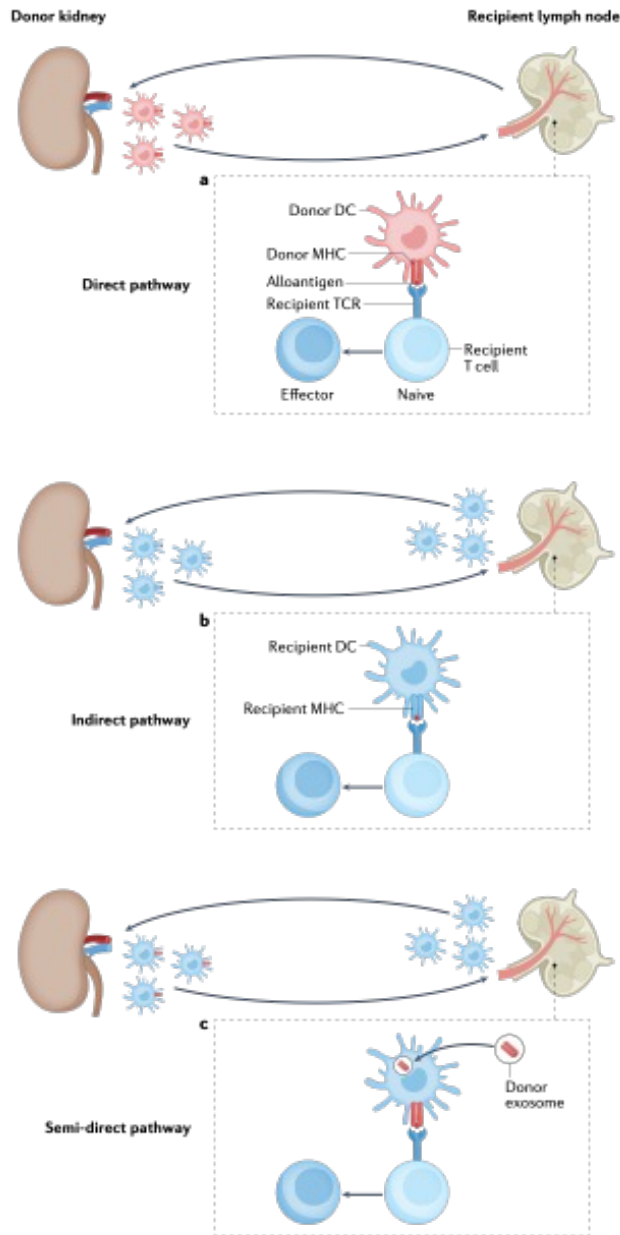


Oltre alle DC del donatore anche le DC del ricevente possono stimolare i linfociti T alloreattivi e provocare il rigetto del trapianto.

Per esempio nei trapianti di rene del ratto era stato osservato che la deplezione delle cellule dendritiche del donatore non impediva il rigetto del trapianto anche se questo si manifestava più lentamente.

Indirect pathway of alloantigen presentation

Meccanismi del riconoscimento delle allomolecole MHC nella fase di priming

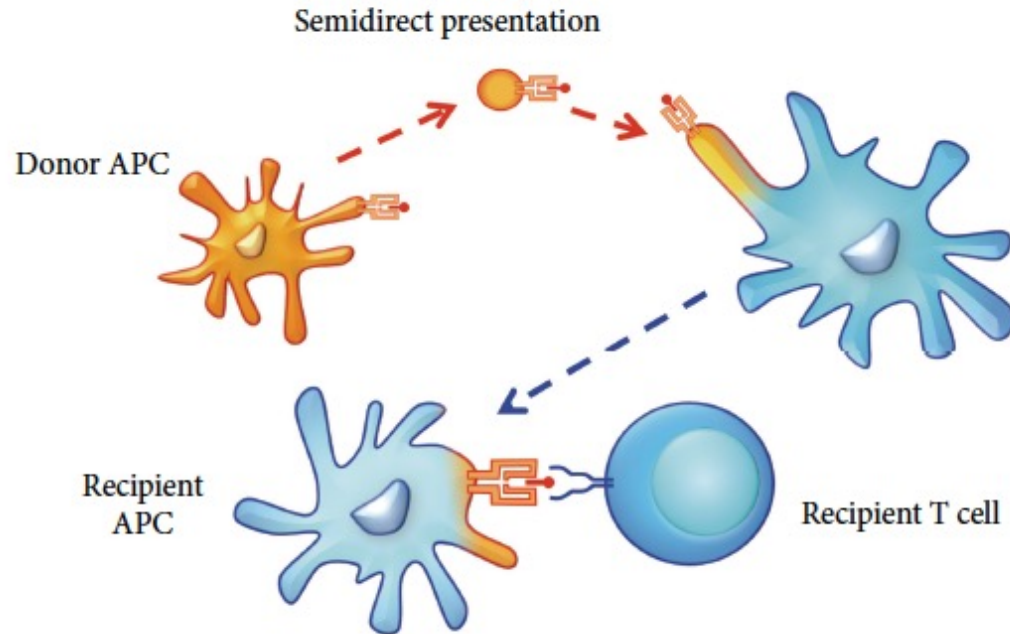


Nella via della **presentazione diretta** è il complesso MHC alloigenico + peptide ad essere riconosciuto dai linfociti T nel linfonodo.

Poiché con il passare del tempo nel trapianto le cellule dendritiche del donatore sono rimpiazzate dalle DC del ricevente è stato suggerito e dimostrato che gli alloantigeni possono essere processati e presentati dalla DC del ricevente. Questa via prende il nome di **presentazione indiretta**.

Ulteriori studi hanno dimostrato che le molecole MHC alloigeniche (del donatore) possono essere trasferite alle cellule dendritiche del ricevente dalle CD del donatore o da altre cellule attraverso esosomi o vescicole. In questo caso i complessi MHC+peptide interi del donatore decorano la membrana plasmatica delle DC del ricevente. Questa via prende il nome di **via semi-diretta**.

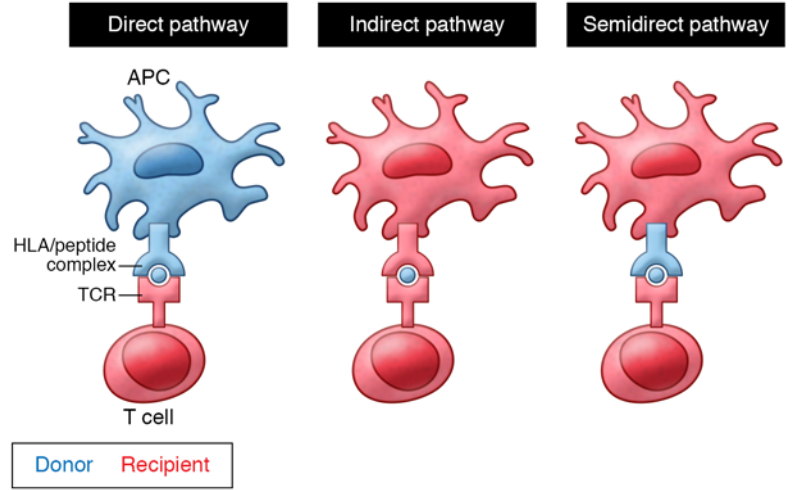
Presentazione semi-diretta



Nella presentazione semi-diretta complessi intatti MHC-peptide sono trasferiti dalle APC del donatore alle APC del ricevente.

Questo trasferimento può avvenire o attraverso il contatto cellula-cellula o attraverso il rilascio di vescicole extracellulari.

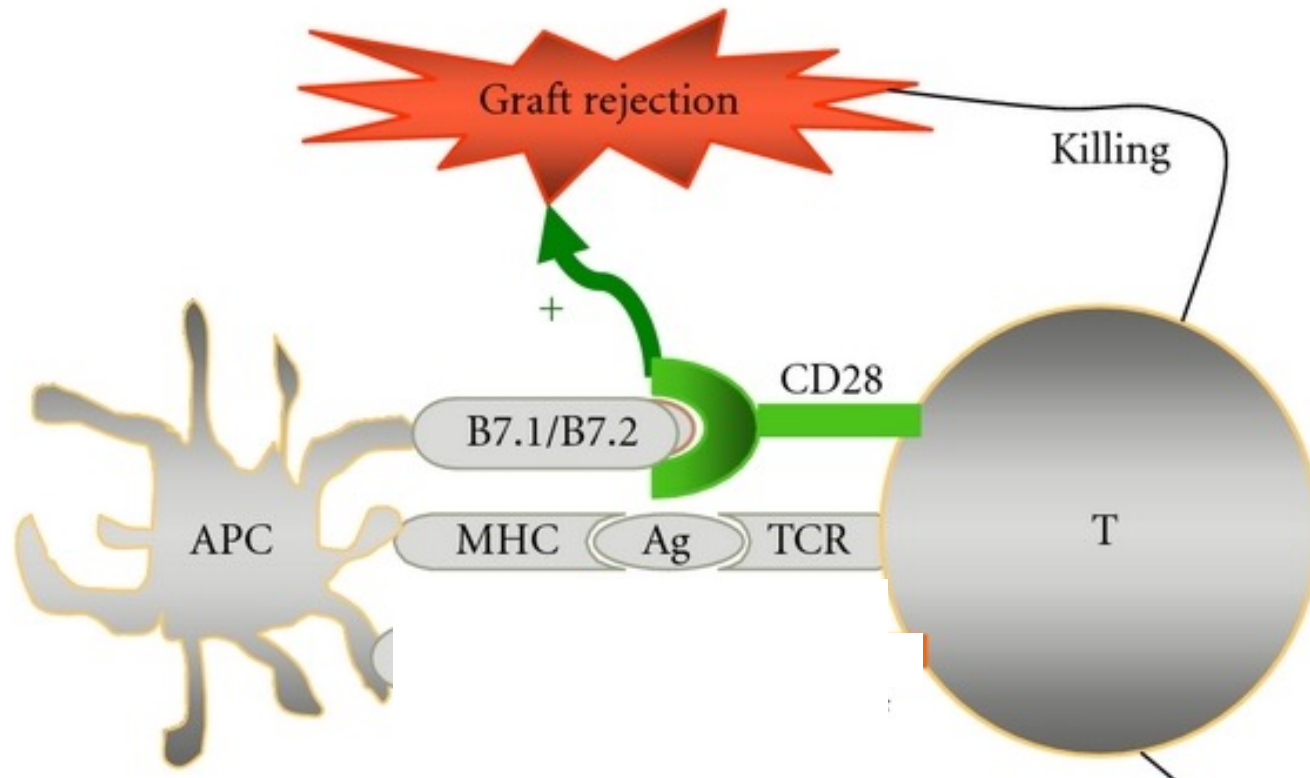
Diversi modi di alloriconoscimento



La risposta T alloreattiva ha inizio quando i linfociti T riconoscono gli alloantigeni presentati dalle APC mature derivanti sia dal trapianto (APC del donatore) o dal ricevente (APC del ricevente).

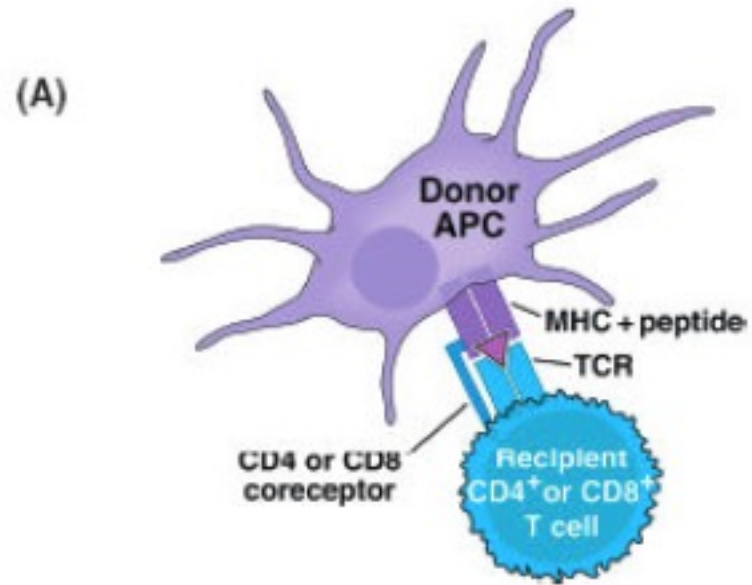
Figure 1. Pathways of allorecognition. Schematic illustration of the three major pathways of allorecognition: direct, indirect, and semidirect. In the direct pathway, donor antigen-presenting cells (APCs) interact directly with recipient T cells. In indirect recognition, recipient APCs present processed donor allogeneic peptides to recipient T cells, similar to more typical immune responses. In the semidirect pathway, recipient APCs acquire donor HLA molecules that present peptides directly to recipient T cells.

Il riconoscimento degli alloantigeni da parte del TCR e la costimolazione da parte del CD28 sono necessari per l'attivazione dei linfociti T alloreattivi



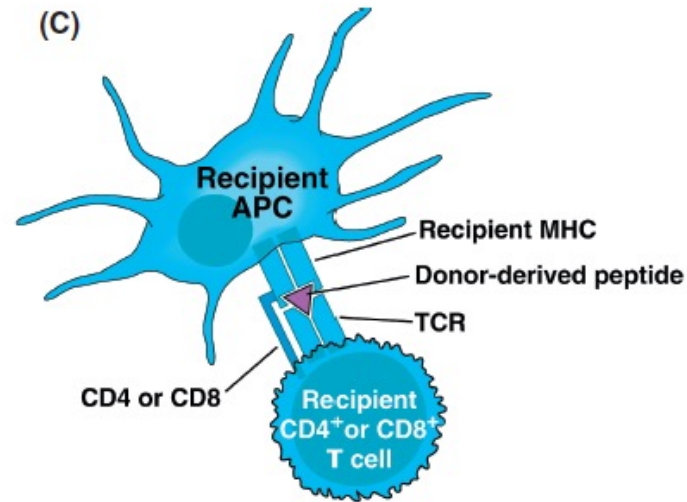
Nel modello murino
Il blocco della
costimolazione da
parte del B7
aumenta la
sopravvivenza dei
trapianti.

Presentazione diretta delle molecole MHC allogeniche



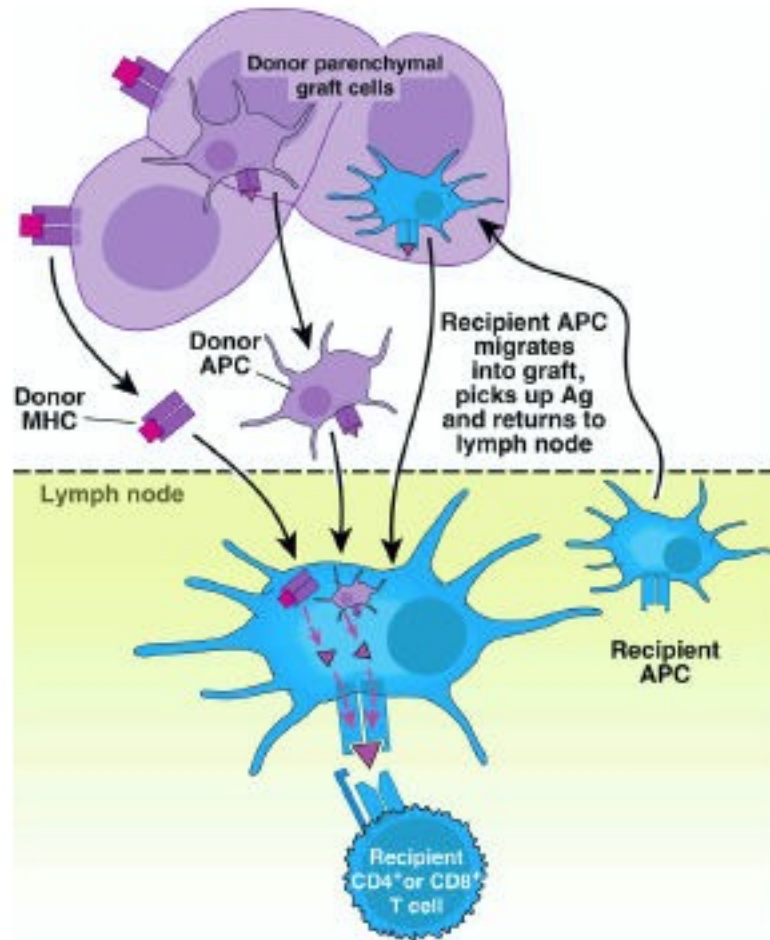
Nella presentazione diretta le cellule dendritiche del donatore migrano negli organi linfoidi secondari del ricevente e attivano i linfociti T alloreattivi del ricevente.

Presentazione indiretta delle molecole MHC allogeniche



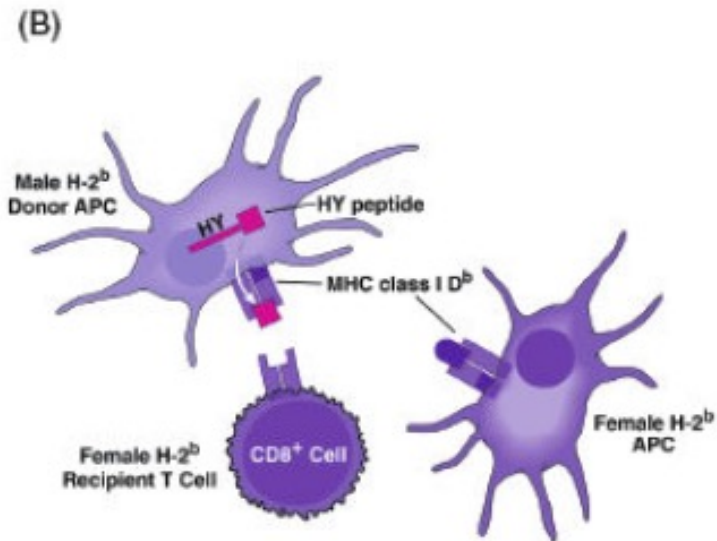
Nella presentazione indiretta le molecole MHC allogeniche devono essere processate e presentate dalle APC del ricevente. Il trapianto di cute da un topo KO per le molecole MHC di classe II è in grado di indurre una risposta T CD4+ verso gli alloantigeni del donatore e la produzione di alloanticorpi. Nel riconoscimento indiretto il TCR del linfocita T alloreattivo riconosce peptidi del donatore presentati dalle proprie molecole MHC. Quindi presentati dalle proprie cellule presentanti l'antigene.

Meccanismi potenziali della processazione indiretta



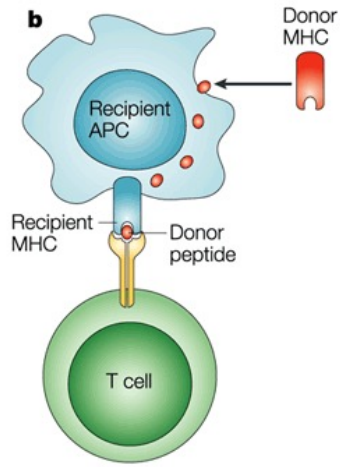
- La presentazione degli antigeni del donatore da parte delle APC del ricevente può avvenire:
- Le APC del ricevente migrano nel trapianto, captano gli antigeni del donatore e ritornano negli organi linfoidi secondari.
 - Le APC del donatore possono migrare negli organi linfoidi secondari del ricevente ed essere endocitate.
 - Le molecole MHC libere del donatore possono essere processate dalle APC del ricevente.

Antigeni minori di istocompatibilità

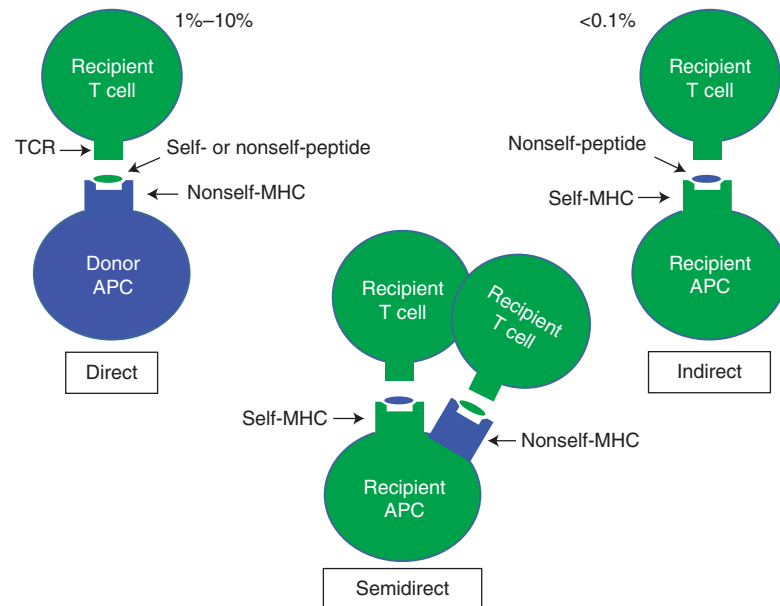


Oltre al riconoscimento diretto delle molecole MHC del donatore le cellule T del ricevente possono essere attivate dagli antigeni minori di istocompatibilità (mH). Un mH è definito come un peptide derivato dal donatore e presentato dalla cellula APC del donatore che esprime la stessa molecola MHC del ricevente. Es le cellule T CD8⁺ di topi femmine di ceppo C57BL/6 mediano il rigetto del trapianto di cute da un topo maschio singenico. Antigene H-Y è un antigene minore di istocompatibilità codificato da un gene localizzato sul cromosoma Y e quindi espresso solo dai maschi.

Natura degli alloantigeni presentati per via indiretta



Frequenza dei linfociti T alloreattivi



Molti degli antigeni presentati per via indiretta includono:

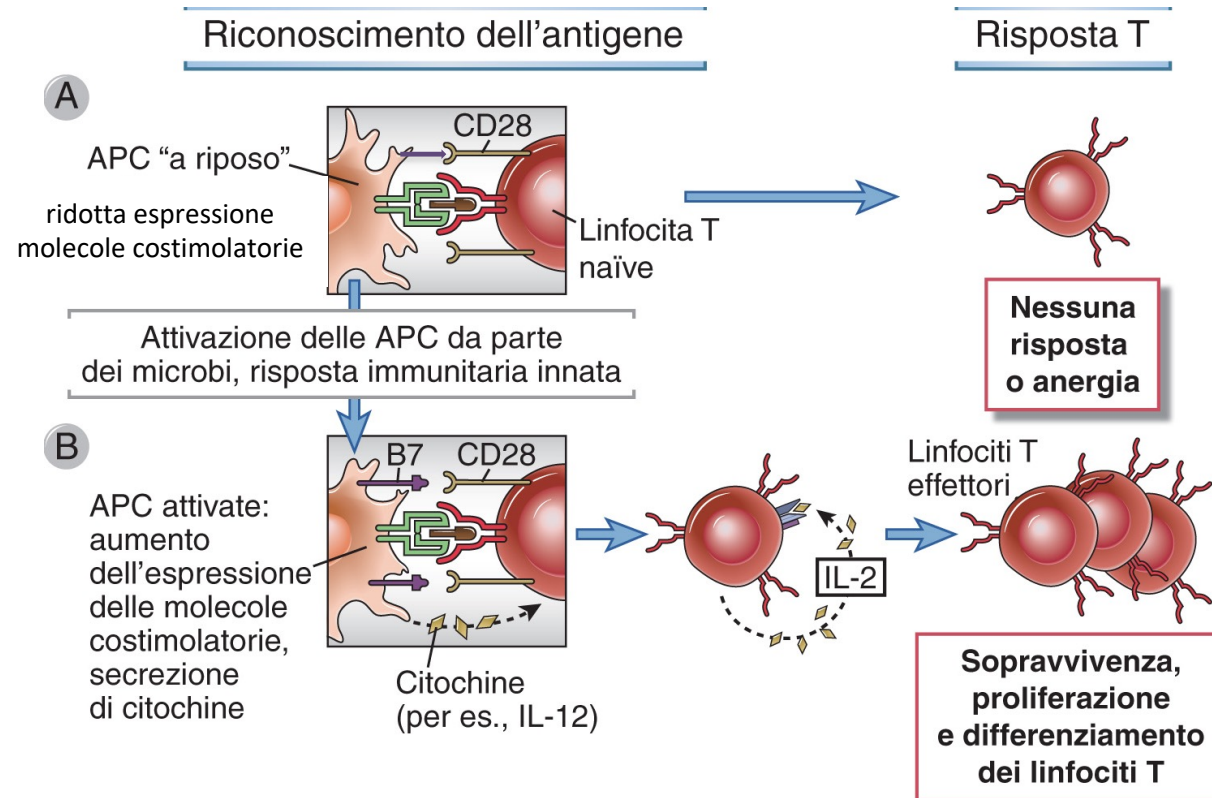
- le regioni polimorfiche delle molecole MHC del donatore.
- antigeni minori di istocompatibilità
- molecole espresse dall'organo trapiantato come la miosina cardiaca nei trapianti di cuore.

• La frequenza di linfociti T alloreattivi attivati per via indiretta è inferiore di quella dei linfociti T attivati per via diretta.

• I linfociti T CD4+ attivati per via diretta ed indiretta differenziano in linfociti Th1 produttori IFN- γ .

Figure 1. Pathways of alloantigen presentation. The three pathways of alloantigen presentation (direct, indirect, and semidirect) are shown. The frequency (%) of T cells that react to a specific pathway is indicated where known. APC, antigen-presenting cell; MHC, major histocompatibility complex molecule; TCR, T-cell receptor for antigen. (From Kaplan et al. 2012; reprinted, with permission, from John Wiley and Sons © 2012.)

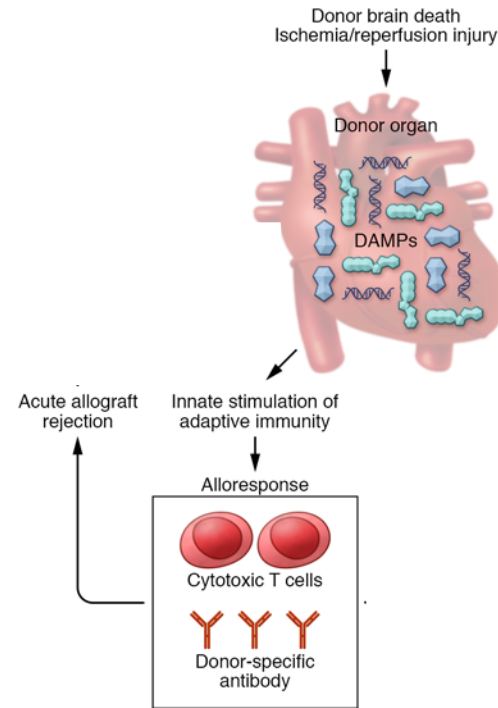
L'espressione delle molecole B7 è aumentata in seguito ad attivazione delle cellule presentanti l'antigene



L'attivazione delle cellule dendritiche è necessaria per attivare i linfociti T alloreattivi.

Le DC attivate up-regolano l'espressione di B7.1, B7.2, delle molecole MHC di classe II ed esprimono specifici recettori per le chemochine permettendo la loro migrazione nei linfonodi.

L'attivazione dell'immunità innata contribuisce al rigetto del trapianto



Sebbene il rigetto del trapianto sia il risultato della risposta immune adattativa specifica per gli antigeni del maggior complesso di istocompatibilità del donatore, studi recenti indicano che anche l'immunità innata svolge un ruolo critico nel rigetto del trapianto di organo solido.

In particolare il danno conseguente alla rimozione dell'organo del donatore e all'impianto nel ricevente determina il rilascio dei "damage associated molecular patterns" (DAMPs) in grado di stimolare le cellule dell'immunità innata e di favorire il rigetto del trapianto.

L'attivazione dell'immunità innata contribuisce al rigetto del trapianto

Key points

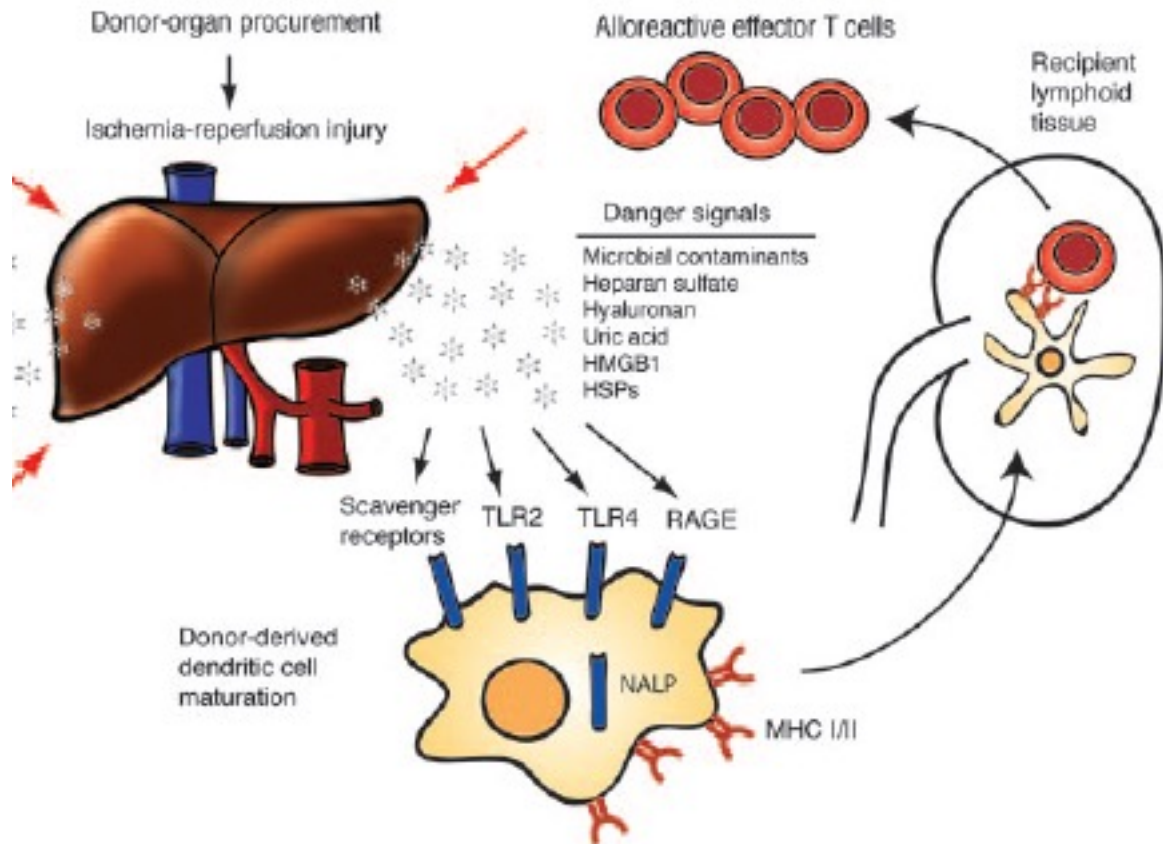
- Sterile inflammation occurs in organs after their surgical removal and implantation into a recipient
- Inflammation that occurs after solid organ transplantation can precipitate acute allograft rejection, impede transplant tolerance and enhance the development of chronic allograft rejection
- Experimental and clinical studies have shown that several endogenous substances, also known as damage associated molecular patterns contribute to both acute and chronic allograft rejection
- Toll-like receptors, which are among the best characterized innate immune receptors, induce inflammation and impair outcomes after solid organ transplantation
- Clinical studies are investigating strategies to inhibit innate immune responses after organ transplantation; approaches to reduce inflammation without compromising host defence to pathogens would substantially improve outcomes for transplant recipients

L'attivazione dell'immunità innata in seguito al trapianto di organo solido determina una infiammazione definita sterile che aumenta il rigetto acuto e cronico.

L'infiammazione sterile nel trapianto di organo solido deriva dal danno conseguente a ischemia-riperfusion (IRI, ischemia reperfusion injury) che avviene in seguito alla cessazione temporanea di apporto di sangue ad un organo.

l'IRI è una componente obbligatoria del trapianto di organo solido dovuta all'espanto e l'impianto dell'organo e influenza la riuscita del trapianto. Per esempio nel trapianto di rene l'aumento del tempo di ischemia da 30 minuti a 6 ore aumenta il rischio di fallimento del trapianto del 40%.

Quali segnali attivano le cellule presentanti l'antigene nel rigetto del trapianto?



Subito dopo il trapianto il danno diretto all'organo o conseguente alla ischemia/riperfusion portano al rilascio di componenti cellulari in grado di stimolare le cellule dendritiche del donatore. Diverse molecole quali HSP, high mobility group box 1 (HMGB1) agiscono da profili molecolari associati al danno (DAMP) stimolando la risposta innata. L'High mobility group box 1 (HMGB1) è una proteina nucleare che rappresenta uno dei DAMPs responsabili dell'infiammazione e dello sviluppo del rigetto del trapianto acuto. HMGB1 induce l'infiammazione attivando il TLR4.

DAMPs e recettori di DAMPs implicati nel trapianto di organo solido

Table 1. DAMPs with supporting evidence in solid organ transplantation

DAMPs released from the intracellular space or exposed on the cell surface upon injury

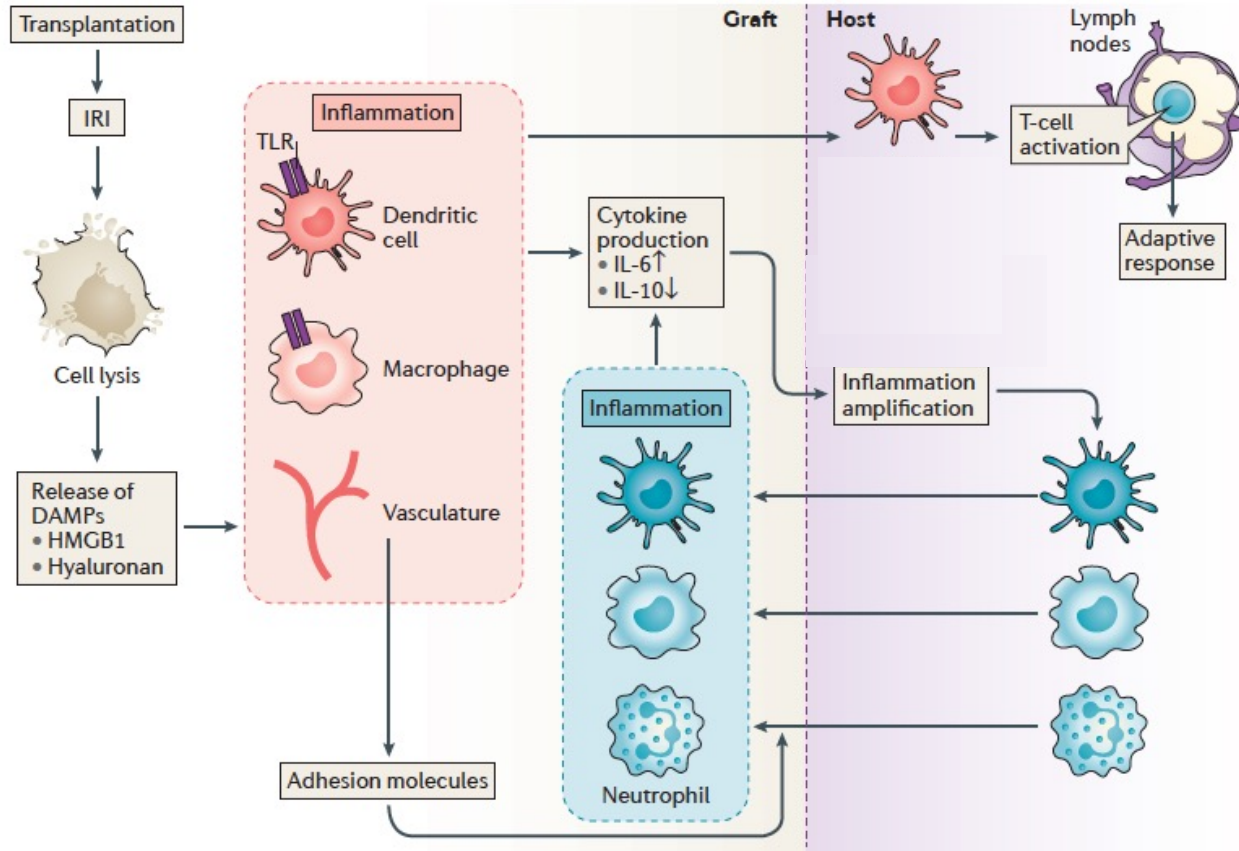
DAMP	Putative receptor(s)	Solid organ(s)
HMGB1	TLR4, RAGE	Heart, lung, kidney, liver
ATP	P1, P2X, P2Y	Heart, liver
Heat shock proteins	TLR2/4, CD40, CD91, LOX-1	Heart, lung, kidney, liver
Nucleic acids/mitochondrial contents	TLR9, NALP3	Heart, lung, kidney, liver

Il rilascio di frammenti di DNA o di DNA mitocondriale dall'organo trapiantato può attivare le cellule dell'immunità innata attraverso la stimolazione del TLR9.

L'ATP extracellulare è riconosciuto da specifici recettori nucleosidici della famiglia dei recettori P2.

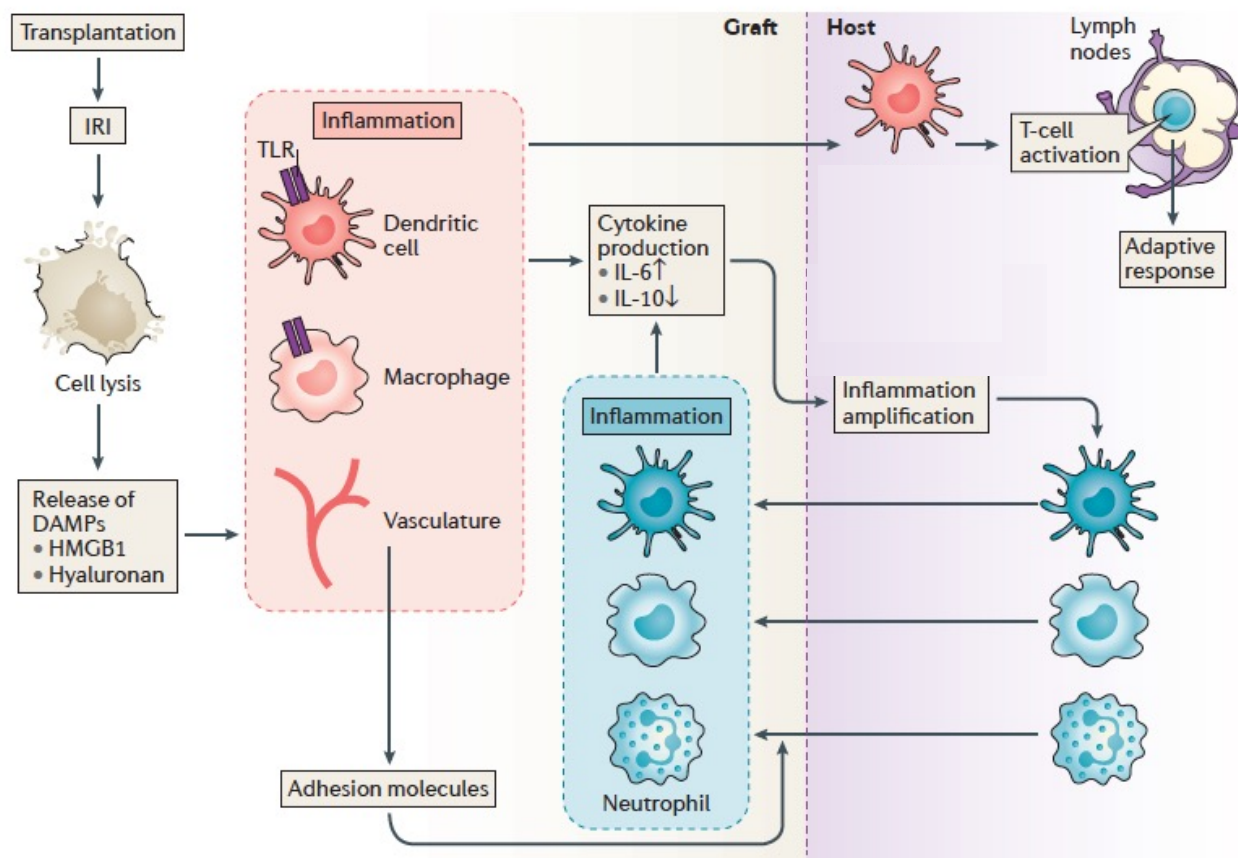
Il trattamento con antagonisti del recettore P2X7 promuove il trapianto di cuore in un modello murino mismatched per le molecole MHC.

Inizio e mantenimento del processo infiammatorio in seguito a trapianto di organo



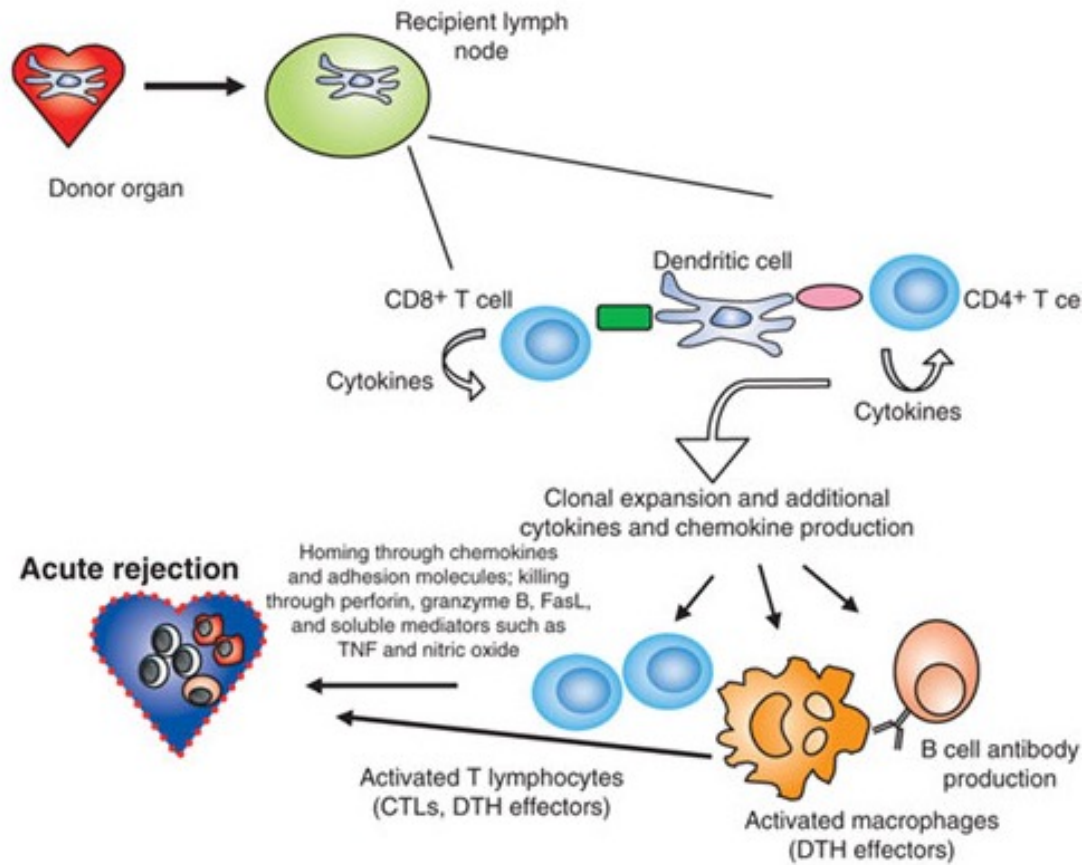
L'ischemia seguita da perfusione causa necrosi del trapianto e danni della matrice extracellulare. Questo processo porta al rilascio di "damage associated molecular patterns" (DAMPs) che aumentano l'infiammazione nell'organo trapiantato attivando le cellule dell'immunità innata (macrofagi e cellule dendritiche) attraverso la stimolazione dei Toll like receptor.

L'infiammazione dopo il trapianto d'organo



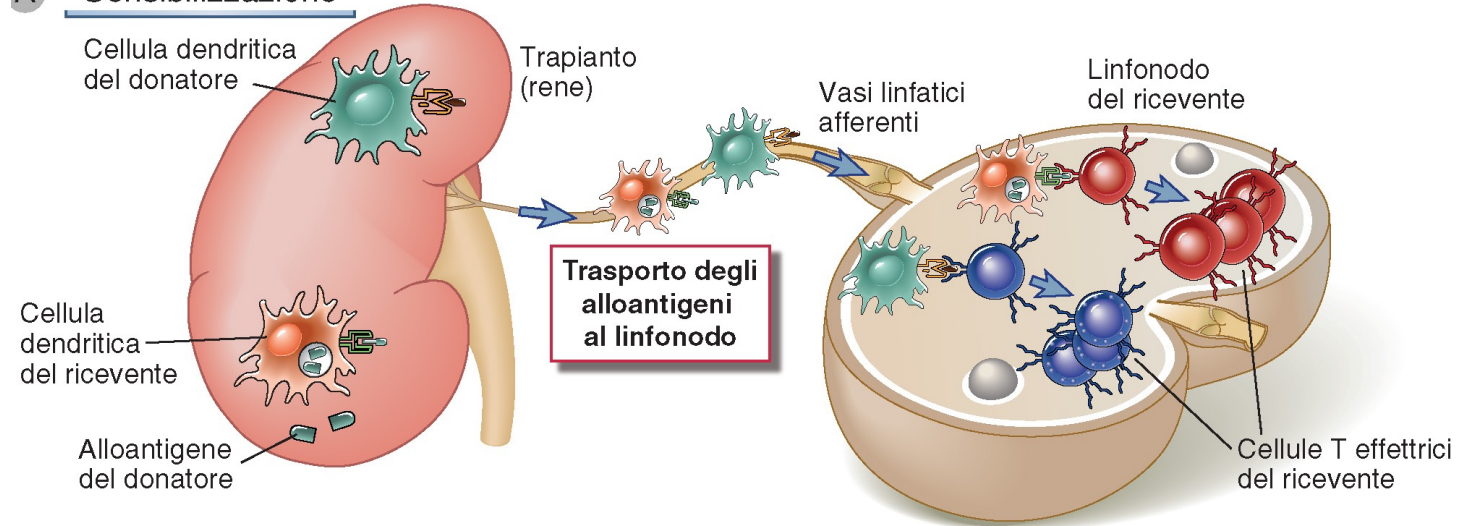
In seguito alla stimolazione dei Toll like receptors le DC e i macrofagi producono citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- α) mentre le cellule endoteliali up-regolano l'espressione delle molecole di adesione come la LFA-1 e VCAM1. Questo facilita il reclutamento dei neutrofili e dei monociti del ricevente che contribuiranno attraverso la stimolazione da parte dei DAMPs al processo infiammatorio. Inoltre le DC attivate migrano nei linfonodi dove attivano le cellule T naive.

Il rigetto del trapianto



In seguito all'attivazione e al differenziamento dei linfociti T alloreattivi nei linfonodi mediante presentazione diretta o indiretta degli alloantigeni da parte delle cellule dendritiche, i linfociti T migrano nell'organo trapiantato dove svolgono le loro azioni effettrici.

A Sensibilizzazione



Attivazione delle cellule T, generazione delle cellule T effettrici mediante la presentazione diretta o indiretta dell'antigene

B Rigetto

