

# Immunodeficienze congenite e acquisite

L'integrità del sistema immunitario è essenziale per la difesa contro gli agenti infettivi e quindi per la sopravvivenza dell'organismo.

Un deficit a carico di una o più componenti del sistema può portare a malattie gravi e spesso mortali conosciute come malattie da immunodeficienza.

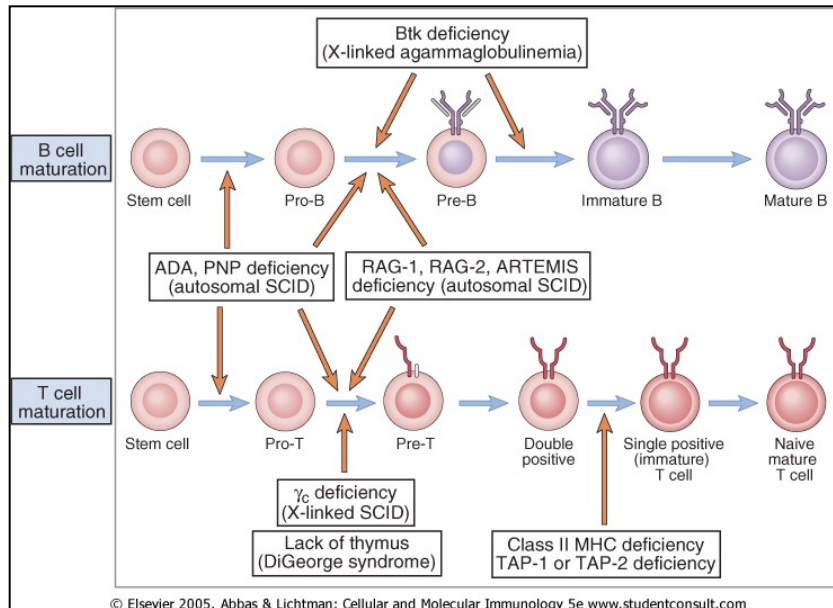
Queste malattie sono caratterizzate da un' aumentata suscettibilità ad infezioni da microrganismi:

**Immunodeficienze primarie o congenite:** causate da alterazioni genetiche a carico di una o qualche componente del sistema immunitario.

**Immunodeficienze acquisite o secondarie:** conseguenti a malnutrizione, farmaci immunosoppressivi, tumori disseminati.

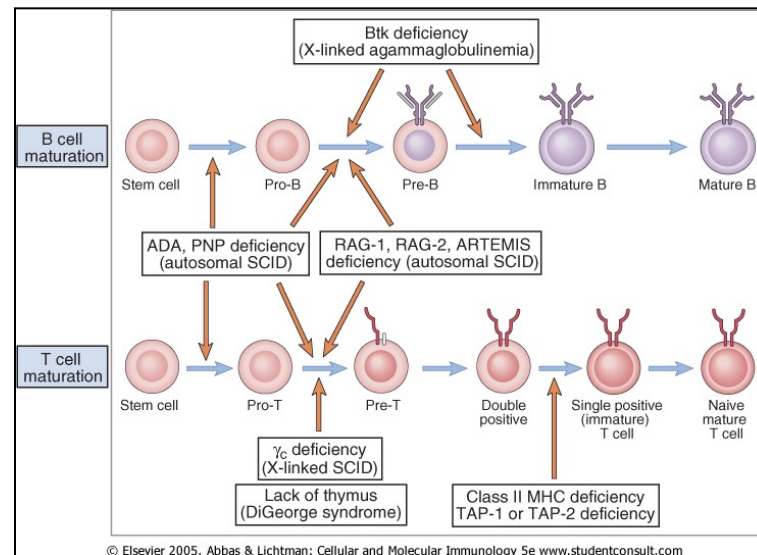
# Immunodeficienze primarie

Le immunodeficienze primarie (PID) comprendono più di 130 disordini diversi dovuti ad alterazioni dello sviluppo o delle funzioni del sistema immune. Nella maggior parte dei casi le PIDs sono disordini monogenici, tuttavia alcune PIDs hanno una origine poligenica. La maggior parte di PIDs sono rare.



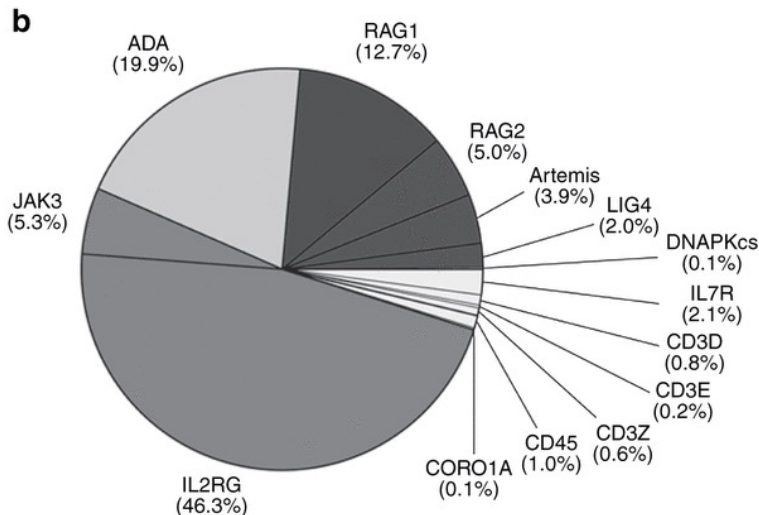
Le immunodeficienze primarie sono classificate sulla base del tipo di componenti del sistema immune che risultano disfunzionali. **Difetti dell'immunità adattativa** includono le immunodeficienze combinate e le sindromi da deficienza della risposta anticorpale. I **difetti dell'immunità innata** includono disordini dei fagociti, del signaling mediato dai Toll like receptor (TLR) e del complemento.

Nelle diverse forme di immunodeficienza primaria l'alterazione può situarsi a diversi stadi dello sviluppo linfocitario o riguardare la risposta dei linfociti maturi all'antigene. Le alterazioni dello sviluppo e della risposta dei linfociti B determinano un deficit nella produzione di anticorpi e nelle difese alle infezioni da parte di patogeni extracellulari. Alterazioni nello sviluppo dei linfociti T determina un deficit della risposta cellulo mediata e un aumento della suscettibilità alle infezioni da parte di microrganismi intracellulari. Anche in questo caso si può avere una alterata risposta anticorpale.



## Immunodeficienze gravi combinate (SCID)

L'immunodeficienza grave combinata è la forma più grave di immunodeficienza. E' stata descritta per la prima volta circa 60 anni fa. I bambini affetti da SCID erano linfopenici e morivano entro il primo-secondo anno di vita a causa di infezioni. Successivamente è stato osservato che le SCID potevano essere ereditate con pattern diversi suggerendo che potessero essere causate da alterazioni di geni diversi. La malattia in alcune famiglie veniva ereditata in modo legato all' X mentre in altre aveva una trasmissione autosomica recessiva. Il primo gene la cui alterazione causava SCID nell' uomo è stato identificato nel 1972 ed è risultato essere il gene codificante l' adenosina deaminasi. Dopo circa 21 anni è stata identificata una seconda causa di SCID legata al cromosoma X.



La SCID è stata la prima immunodeficienza ad essere trattata con il trapianto di midollo osseo nel 1968. la prima ad essere trattata con la terapia genica nel 2000.

# Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da SCID

## Classical SCID

---

Present in infancy

Persistent viral respiratory +/-  
gastrointestinal infection

*Pneumocystis jiroveci* pneumonitis

Disseminated BCG infection

Failure to thrive

Superficial candidiasis

Maternofoetal graft versus host disease

Absent lymphoid tissue

Absent immunoglobulins

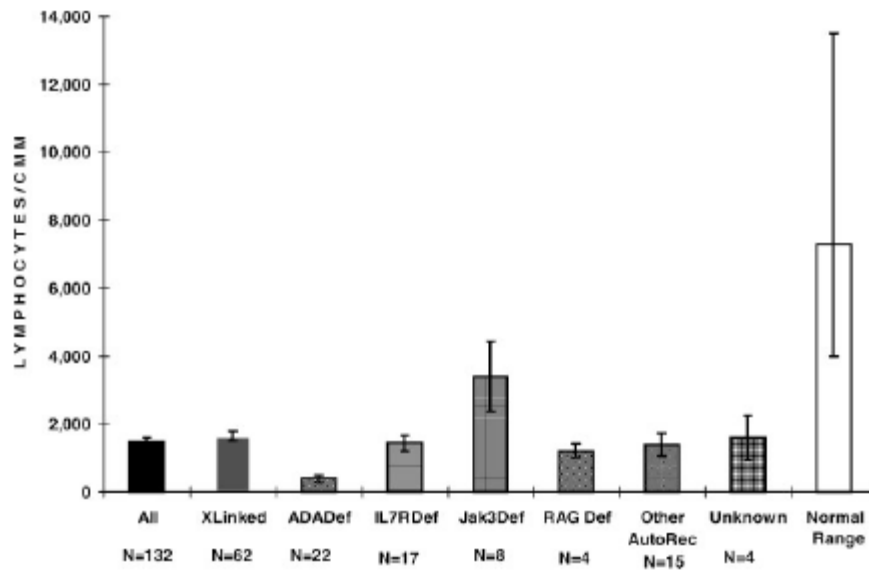
Absent T lymphocytes

---

Le SCID hanno una prevalenza di circa 1:50000 nati e sono più frequenti nei maschi. I bambini affetti da SCID presentano nei primi mesi di vita diarrea e ritardo nella crescita. Tali pazienti contraggono infezioni delle vie respiratorie dal primo anno di vita e se non curati muoiono entro il secondo anno di vita. I bambini affetti da SCID sono linfopenici e i loro linfociti non proliferano *in vitro* in risposta a mitogeni, antigeni o cellule allogeniche. Le immunoglobuline seriche sono ridotte o assenti. Il timo è ridotto e manca di timociti.

Oltre ad infezioni da *Streptococcus pneumoniae*, citomegalovirus e adenovirus i pazienti possono sviluppare malattie gravi e anche fatali a vaccinazione con vaccini vivi come nel caso del Bacillo di Calmette-Guérin (vaccino contro la tubercolosi).

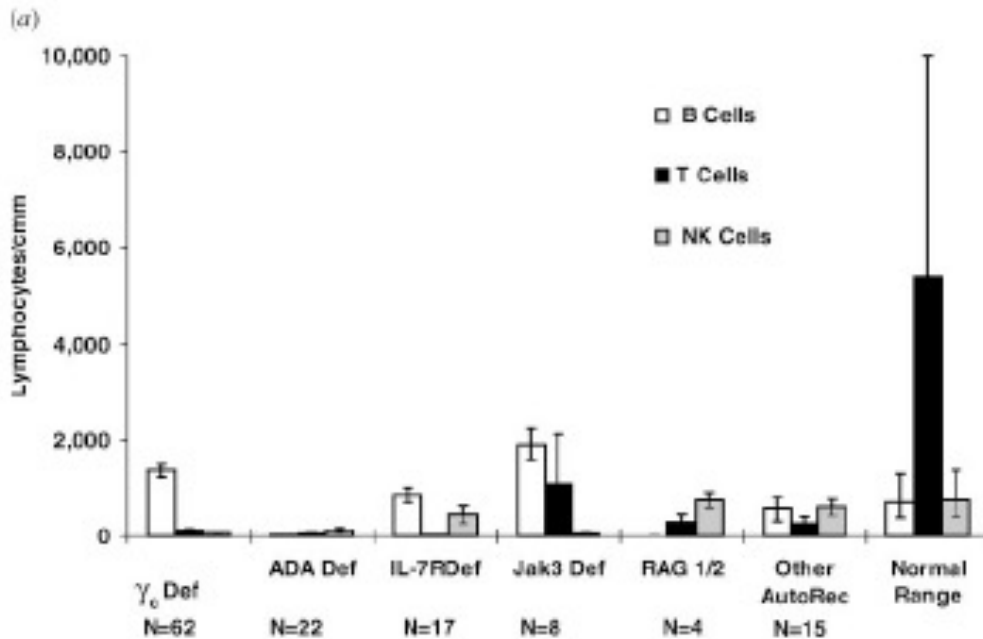
# I bambini affetti da SCID presentano una riduzione del numero dei linfociti.



Il numero dei linfociti T nei bambini affetti da SCID è inferiore a 2000/cm<sup>3</sup> di sangue

**Figure 1** Means  $\pm$  SEM of absolute lymphocyte counts in 132 SCID infants at presentation, showing the characteristic of lymphopenia in all forms of SCID.

# Alterazioni nel numero di cellule T , B, NK si osservano nelle SCID.



Studi citofluorimetrici hanno dimostrato che la riduzione delle popolazioni linfocitarie T, B e di cellule NK varia a seconda delle alterazioni geniche che causano la SCID.

# Fenotipo delle SCID

Table 1 | **Aetiologies of severe combined immunodeficiency**

Type of SCID	Chromosomal location	Reference
<b><i>T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup></i></b>		
Interleukin-7 receptor $\alpha$ -chain deficiency	5p13	2
CD3 $\delta$ -chain deficiency	11q23	3
CD3 $\epsilon$ -chain deficiency	11q23	4
<b><i>T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup></i></b>		
X-linked recessive SCID ( $\gamma_c$ deficiency)	Xq13.1	5
CD45 deficiency	1q31–1q32	6
JAK3 deficiency	19p13.1	7
<b><i>T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup></i></b>		
Artemis gene-product deficiency	10p13	8
RAG1 and RAG2 deficiency	11p13	9
<b><i>T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup></i></b>		
Adenosine-deaminase deficiency	20q13.11	10

$\gamma_c$ , common cytokine-receptor  $\gamma$ -chain; JAK3, Janus kinase 3; NK, natural killer; RAG, recombination-activating gene; SCID, severe combined immunodeficiency.

Quattro diversi fenotipi sono identificabili nelle SCID sulla base dell'influenza del gene difettivo sullo sviluppo delle cellule B e delle cellule NK. Tutte le SCID presentano un difetto di linfociti T.



# Adenosin deaminasi deficiency (ADA)

## SCID CON FENOTIPO T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup>

L'assenza dell'enzima adenosin deaminasi come causa di SCID è stata identificata da Gilblett nel 1972. Questo difetto è responsabile di circa il 17% delle SCID umane. ADA è un enzima coinvolto nella degradazione delle purine e mutazioni nel gene codificante ADA sono responsabili dell'accumulo di deossadenosina e dei suoi precursori che mediano la morte apoptotica nei linfociti. I pazienti affetti da ADA presentano anomalie dello scheletro e sono caratterizzati da una profonda riduzione dei linfociti che è superiore agli altri tipi di SCID.

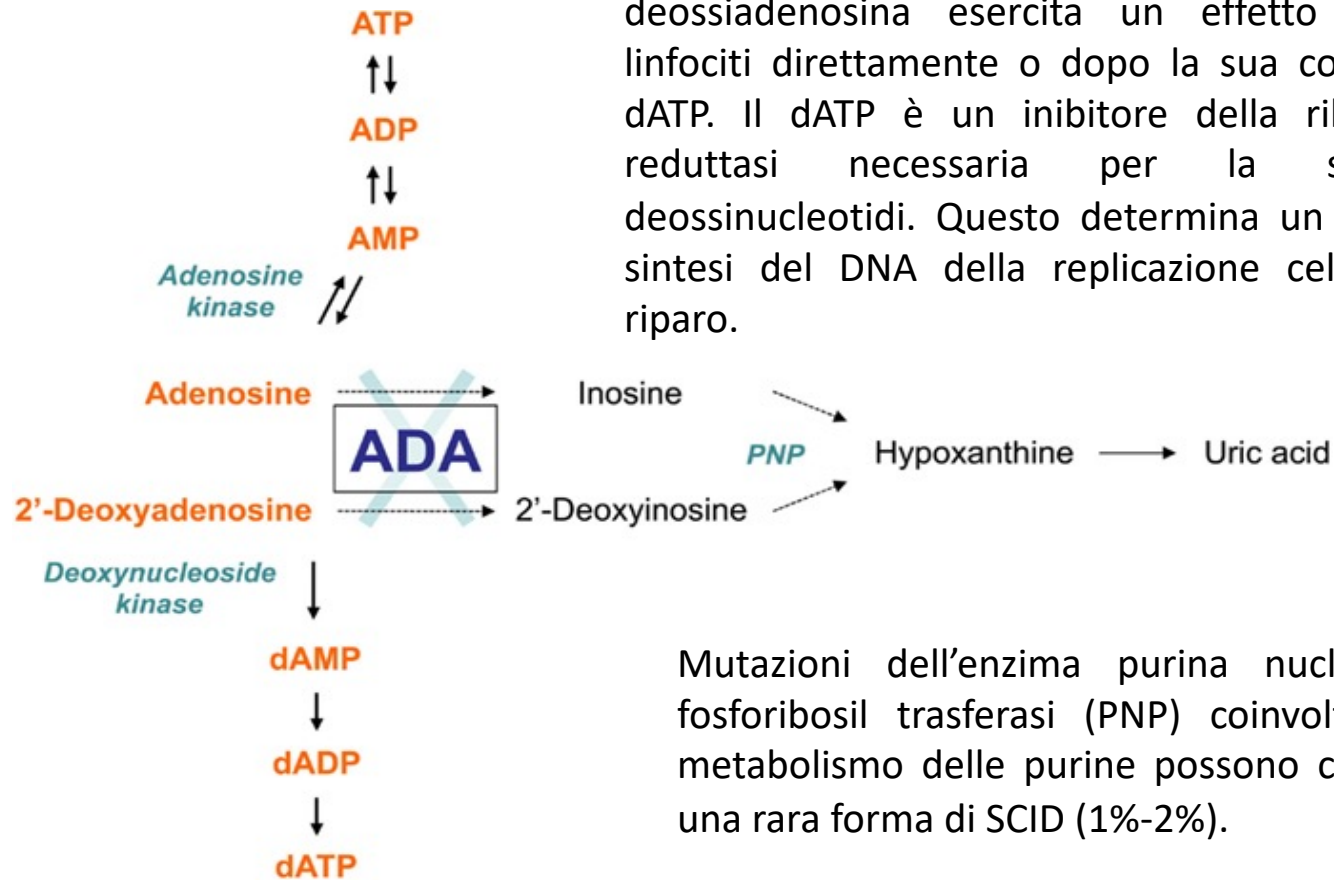
### T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup>

Adenosine-deaminase deficiency

20q13.11

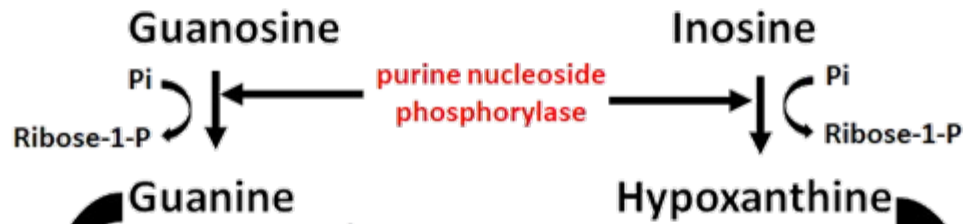
Mutazioni dell'enzima nucleoside purinico fosforilasi (PNP) coinvolto nel metabolismo delle purine possono causare una rara forma di SCID (1%-2%).

ADA catalizza la deaminazione della adenosina e della 2'-deossiadenosina a inosina e 2'-deossinosina. I difetti di ADA determinano un accumulo di adenosina, deossiadenosina e dATP. L'accumulo di 2'-deossiadenosina esercita un effetto tossico sui linfociti direttamente o dopo la sua conversione in dATP. Il dATP è un inibitore della ribonucleotide reductasi necessaria per la sintesi dei deossinucleotidi. Questo determina un blocco della sintesi del DNA della replicazione cellulare e del riparo.

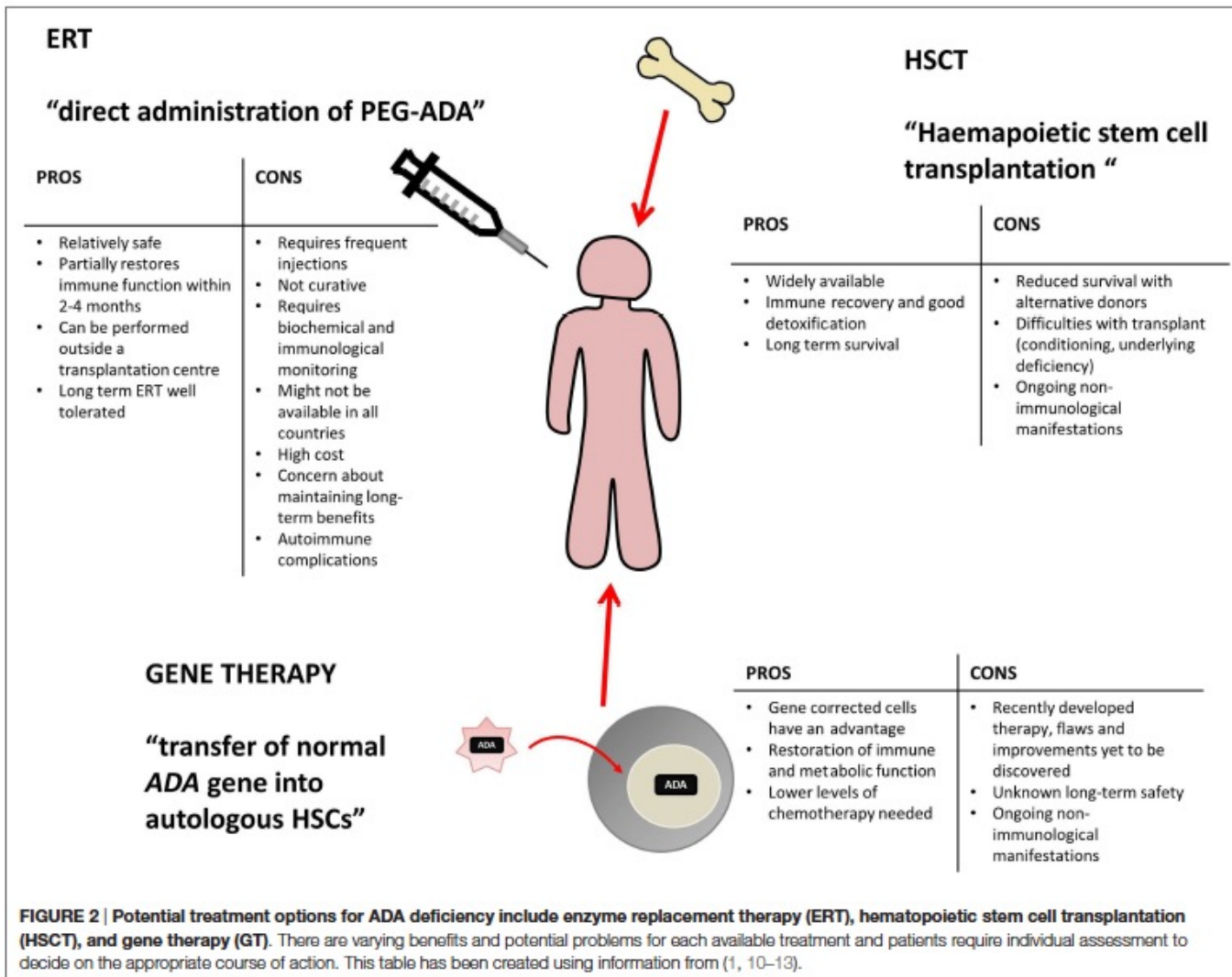


Mutazioni dell'enzima purina nucleoside fosforibosil trasferasi (PNP) coinvolto nel metabolismo delle purine possono causare una rara forma di SCID (1%-2%).

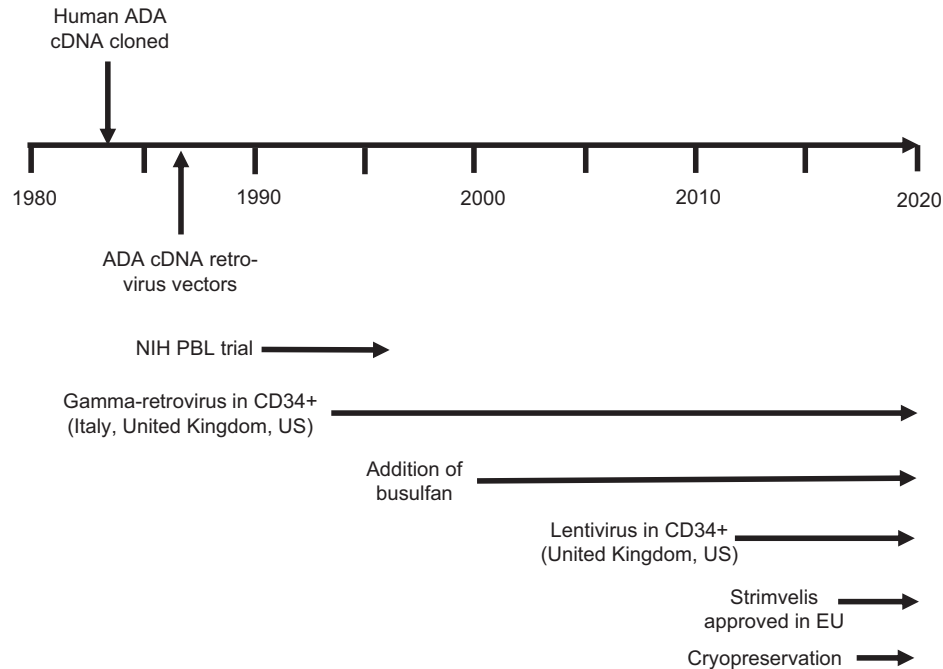
## Deficit della purina nucleoside fosfo ribosil trasferasi (PNP)



L'enzima PNP catalizza la conversione dell'inosina e della guanosina in ipoxantina e guanina. Mutazioni dell'enzima fosforilasi nucleosidica purinica (PNP) causano un accumulo di deossiguanosina e deossiguanosina trifosfato che sono tossiche per i linfociti T. Questa è una rara forma di SCID (1%-2%).



# Hematopoietic stem cell gene therapy



Dal 2000  
sono stati  
trattati 40  
individui.

**FIG 4.** Timeline for development of HSC-GT for ADA deficiency. After identification and cloning of the cDNA for ADA, retroviral vectors were developed to efficiently deliver ADA. In 1990, the first gene therapy trial was initiated at the National Institutes of Health (*NIH*) by using patients' peripheral blood lymphocytes (*PBL*), followed by use of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. Since 2000, use of busulfan has been gradually incorporated into HSCT-GT, including lentivirus-based trials. In 2016, Strimvelis was approved for clinical use in the European Union (*EU*). Currently, the effect of cryopreservation of transduced cells is being explored.

## SCID CON FENOTIPO $T^+B^+NK^-$

### IMMUNODEFICIENZA GRAVE COMBINATA LEGATA AL CROMOSOMA X

La SCID X-linked rappresenta la forma di SCID più comune con una frequenza del 46%. Dall'inizio era stato osservato che la SCID era più frequente nei maschi e il clonaggio e il mappaggio del gene codificante per la catena gamma del recettore dell'IL-2 (IL2RG) nella stessa regione genica responsabile della X-SCID resero tale gene un candidato per la X-SCID.

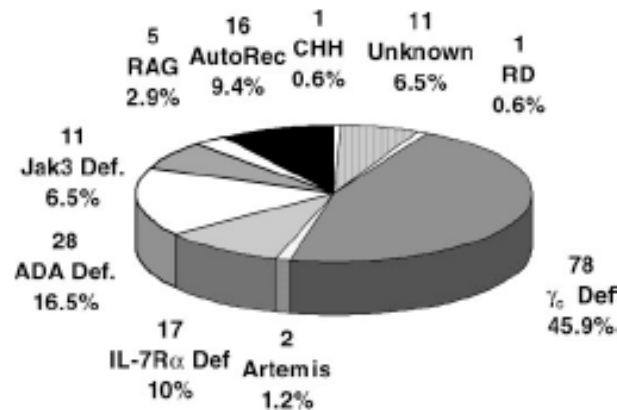
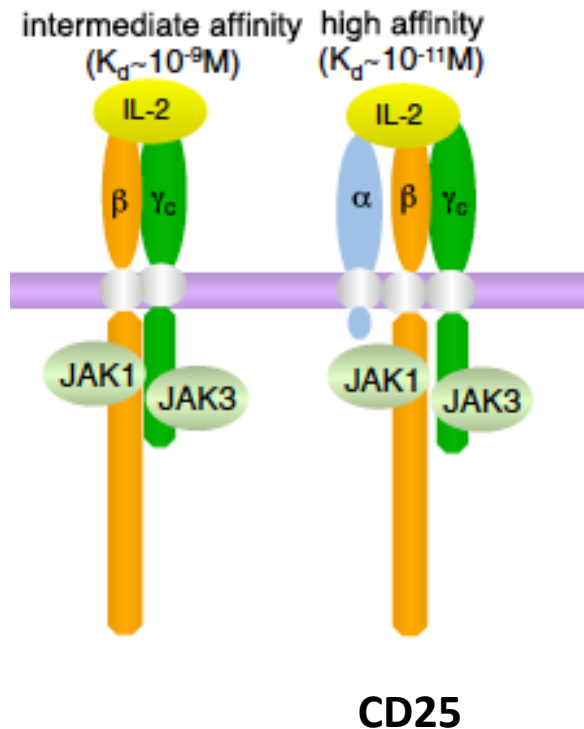


Figure 4 Relative frequencies of the different genetic types of SCID among 170 patients seen consecutively by the author over 3.5 decades.

#### $T^+B^+NK^-$

X-linked recessive SCID ( $\gamma_c$ deficiency)	Xq13.1	5
CD45 deficiency	1q31-1q32	6
JAK3 deficiency	19p13.1	7

## Recettori dell'IL-2

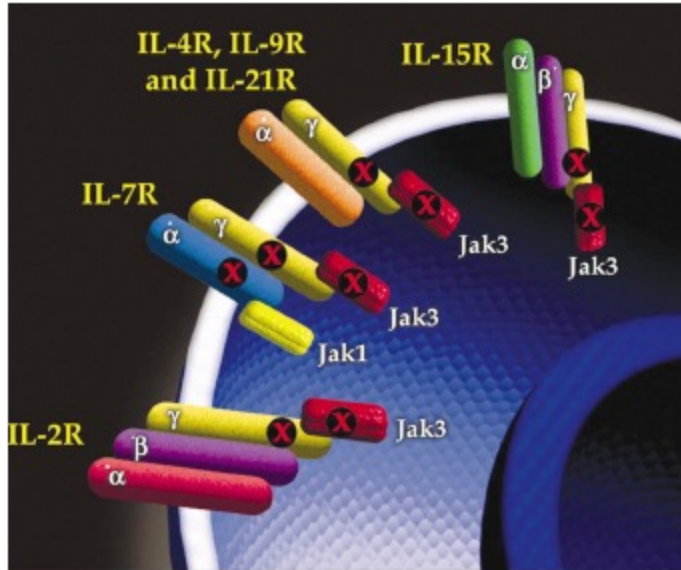


I recettori per l'IL-2 sono costituiti da varie combinazioni delle catene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

La catena  $\alpha$  dell'IL-2 è assente o poco espressa sui linfociti T a riposo ma viene attivamente trascritta in seguito all'attivazione dei linfociti T.

Il recettore ad affinità intermedia è costituito dal dimero  $\beta$  e  $\gamma$  ed è espresso in modo costitutivo dai linfociti T e dalle cellule NK. In seguito all'attivazione dei linfociti T la catena  $\alpha$  neosintetizzata si associa al dimero  $\beta$  e  $\gamma$  formando il recettore ad alta affinità (CD25).

Sin dall'inizio poiché era stato dimostrato che l'assenza di IL-2 non altera lo sviluppo dei linfociti T e delle cellule NK e che il fenotipo della XSCID era più grave di quello causato dalla deficienza di IL-2 è stato ipotizzato che la catena  $\gamma$  fosse condivisa da altri recettori per le citochine.



Successivamente è stato dimostrato che una sottofamiglia di citochine quali l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 hanno in comune questa catena nei loro recettori che è stata denominata la catena comune  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ).

La X-SCID è caratterizzata dall'assenza di cellule T e NK mentre il numero di linfociti B è normale ( $T^+B^+NK^-$ ).



# Relazione fra il ruolo della catena $\gamma$ (o Jak3) con il fenotipo dei pazienti SCID (**T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup>**)

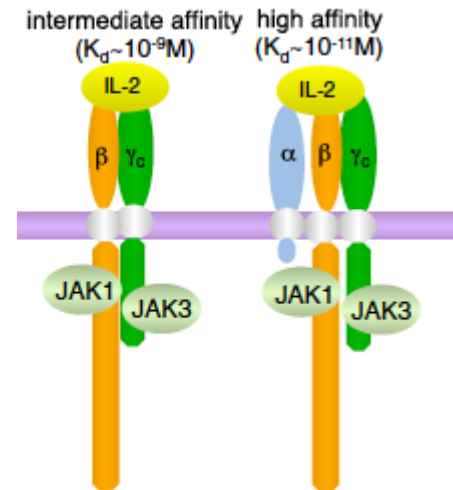
Assenza dei T (T<sup>-</sup>) = L'alterazione della segnalazione della IL-7 determina un blocco dello sviluppo dei timociti allo stadio di doppi negativi prima del riarrangiamento produttivo dei geni del TCR. Questa citochina contribuisce con l'IL-15 inoltre alla sopravvivenza dei linfociti T CD8<sup>+</sup> della memoria.

Assenza NK (NK<sup>-</sup>)= l'IL-15 è un fattore critico per lo sviluppo e la sopravvivenza delle cellule NK e l'assenza di tali cellule negli SCID è il risultato del loro blocco dello sviluppo in assenza di una corretta azione dell'IL-15.

Presenza dei (B<sup>+</sup>)= Le cellule B sono presenti nei pazienti con difetti della catena  $\gamma$  o Jak3 dimostrando che diversamente dai timociti lo sviluppo dei B è indipendente dalla presenza della IL-7. Tuttavia la funzione delle cellule B (attivazione difettiva, mancanza di switch) è compromessa non solo dall'assenza delle cellule T ma anche dall'assenza di IL-4 e IL-21.

## Janus Kinase 3 deficiency (JAK3 deficient SCID) determina lo stesso fenotipo SCID delle mutazioni della catena $\gamma$ comune

Il clonaggio dei diversi recettori delle citochine ha notevolmente contribuito alla comprensione del meccanismo di azione delle citochine. Nel caso della famiglia dei recettori che condividono la catena  $\gamma$  comune ( $\gamma_c$ ), l'identificazione della famiglia delle Jak chinasi ed in particolare dell'associazione fra Jak3 e la catena  $\gamma_c$  ha suggerito che mutazioni in questo gene potessero essere responsabili di forme recessive di SCID.



# Funzione di delle Janus chinasi associate ai recettori delle citochine

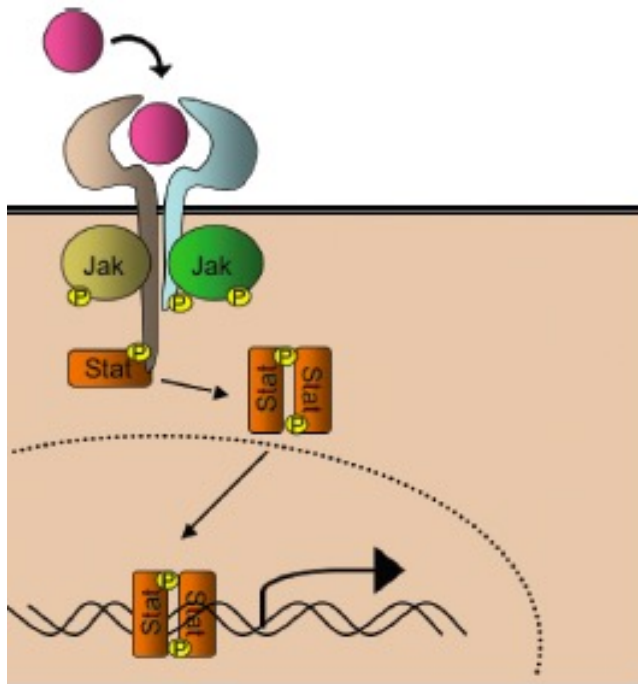
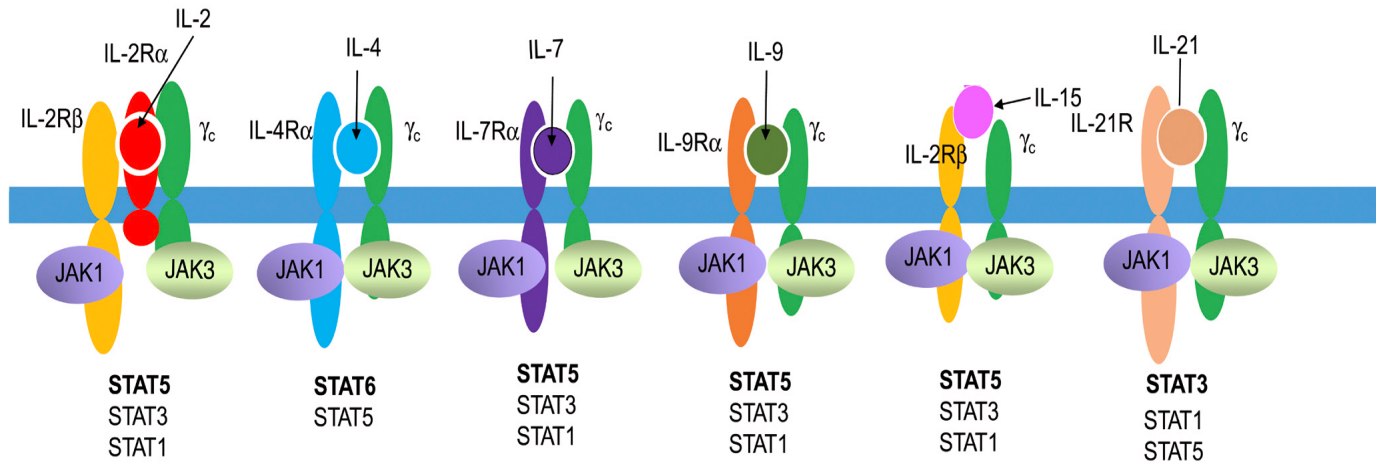


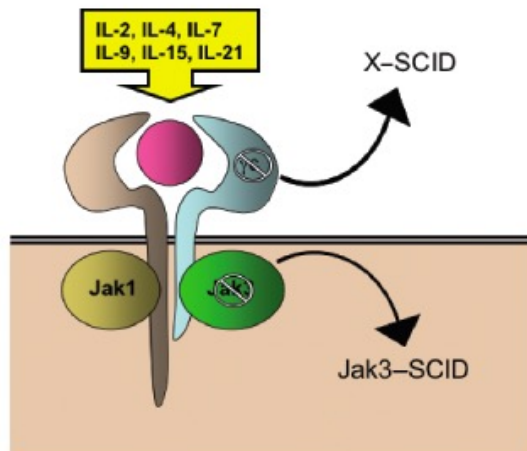
Fig. 1. Overview of cytokine signaling. Upon ligand binding, cytokine receptor-associated Janus kinases (Jaks) are activated by transphosphorylation. Stat proteins bind the phosphorylated receptor chains allowing the Jaks to phosphorylate the Stat. Phosphorylated Stats translocate and accumulate in the nucleus where they regulate gene expression.

In seguito al legame fra citochina e recettore le Jak sono attivate attraverso transfosforilazione. Le proteine Stat legano le catene del recettore fosforilate e in seguito a fosforilazione da parte delle Jak dimerizzano e migrano nel nucleo dove regolano l'espressione genica.

## Famiglia di citochine $\gamma_c$ e loro recettori



**Figure 1.**  $\gamma_c$  family cytokines and their receptors. Shown is the receptor for each  $\gamma_c$  family cytokine as well as the interacting Janus kinase 1 (JAK1) and JAK3 kinases and the signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins activated by each cytokine. DC, dendritic cell; IL, interleukin.



**Fig. 2.** The molecular basis of severe combined immunodeficiency. A number of cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21) utilize the common  $\gamma$  chain ( $\gamma_c$ ) in conjunction with a ligand-specific chain to form their receptors. These receptor subunits bind Jak3 and Jak1. Mutations of IL-7R,  $\gamma_c$ , and Jak3 disrupt cytokine signaling and lead to severe combined immunodeficiency (SCID); in fact, mutations of these genes may account for two-thirds to three-quarters of the cases of SCID.

Inizialmente è stato dimostrato che solo due citochine: l'IL-2 e l'IL-4 attivavano Jak3. Successivamente è stato dimostrato che anche gli altri recettori per le citochine che utilizzano la catena  $\gamma$  comune legano Jak3.

Mutazioni in Jak3 sono state identificate nel 7-14% delle SCID.

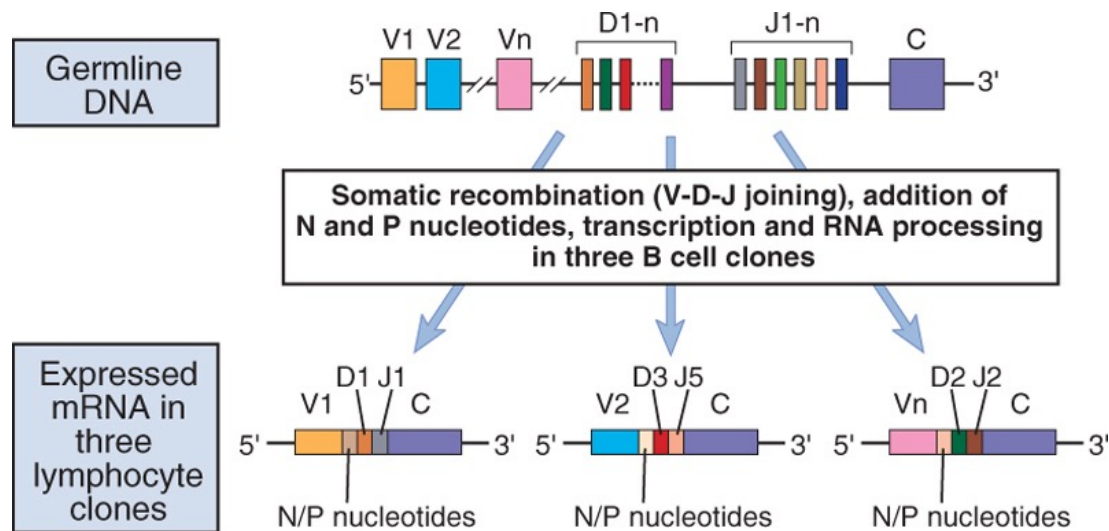
# Deficienza del CD45

Forma autosomica recessiva di SCID umana caratterizzata da una assenza di T e NK ma un alto numero di cellule B. CD45 è una fosfatasi che agisce regolando le src chinasi richieste nell'attivazione dei linfociti B e T. I pazienti non rispondono ai mitogeni e le immunoglobuline seriche diminuiscono nel tempo.

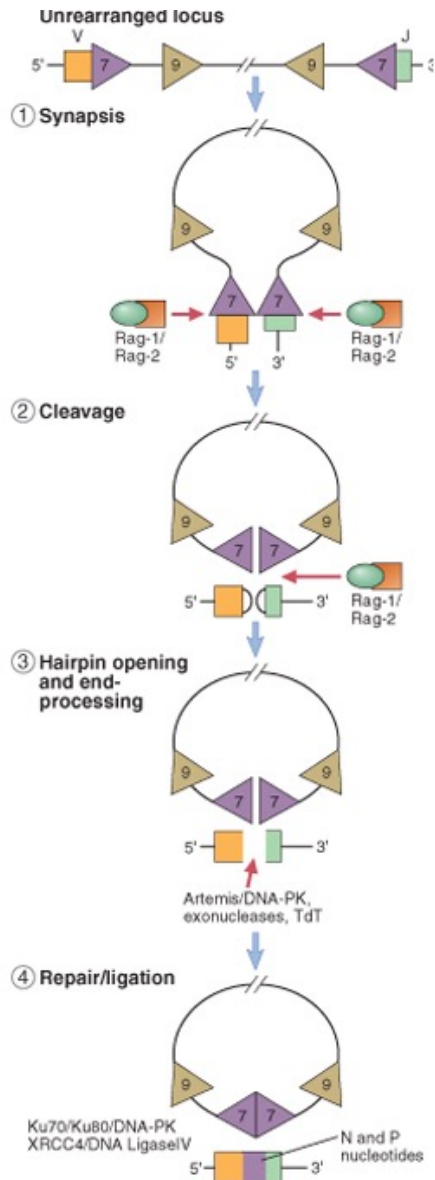
# Immunodeficienze gravi combinate causate da difetti nella ricombinazione V(D)J causano il fenotipo **T-B-NK+**

**T-B-NK<sup>+</sup>**

Artemis gene-product deficiency	10p13	8
RAG1 and RAG2 deficiency	11p13	9



## Eventi nel processo di ricombinazione V(D)J



1) **Sinapsi:** due segmenti genici codificanti e le RSS vengono in contatto grazie alla formazione di un anello sul cromosoma.

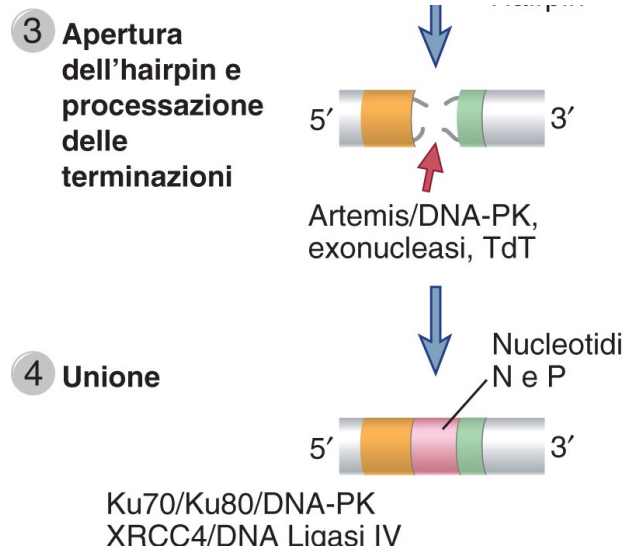
2) **Taglio:** Rag1 introduce una rottura sul doppio filamento di DNA alle giunzioni fra segmento codificante e RSS permettendo la formazione delle hairpin.

3) **Apertura delle hairpin e processazione.** Artemis apre le hairpin. La DNA PK fosforila e attiva Artemis. Le estremità del DNA sono modificate attraverso delezione o aggiunta di nucleotidi da parte della TdT.

4) **Unione delle estremità non omologhe:** Le proteine Ku80, Ku70 si associano alle estremità del DNA che sono unite ad opera della DNA ligasi IV.

**Mutazioni in RAG1, RAG2, Artemis, DNA-PK, DNA ligasi IV causano SCID**

# Le estremità codificanti sono ricongiunte mediante il processo di riparazione delle rotture del doppio filamento definito Non homologous end joining



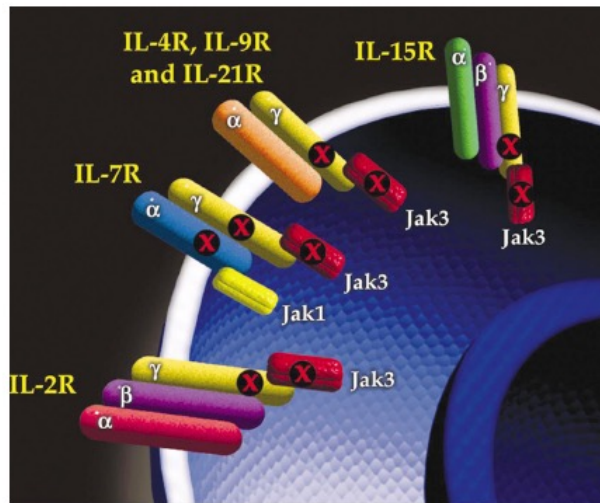
**Apertura delle hairpin e processazione.** Artemis è una endonucleasi che apre le hairpin. La DNA PK fosforila e attiva Artemis. Le estremità del DNA sono modificate attraverso delezione o aggiunta di nucleotidi da parte della TdT.

**Mutazioni in RAG1, RAG2, Artemis, DNA-PK, DNA ligasi IV causano SCID**



## Alterazioni geniche che causano **SCID T-B+NK+**

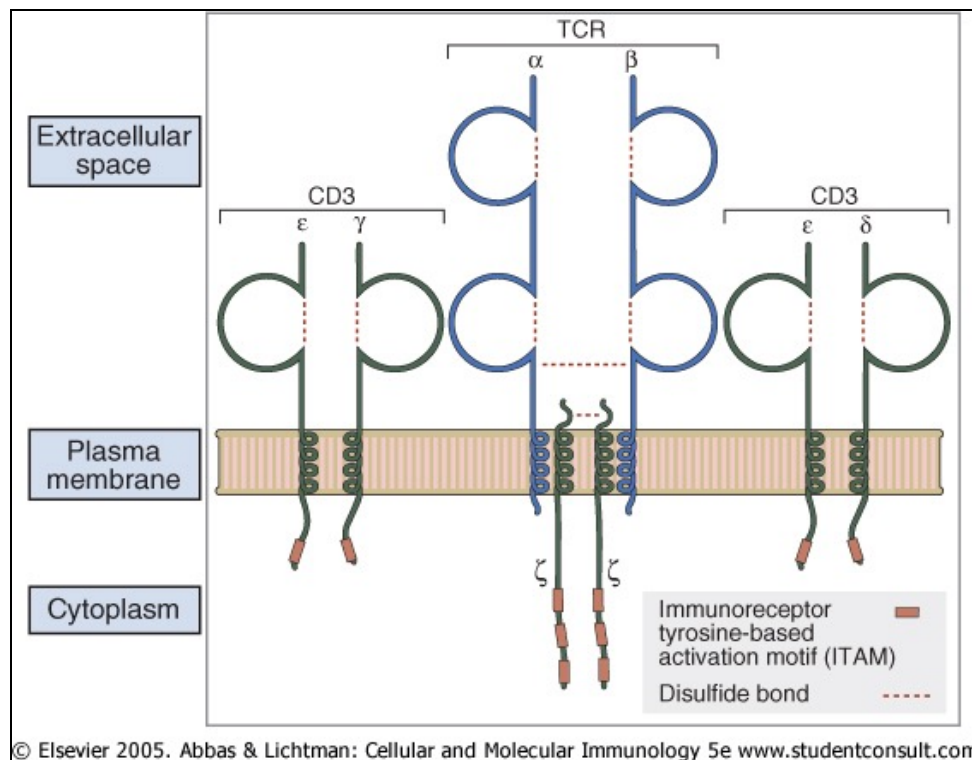
SCID causate da mutazioni nella catena  $\alpha$  del recettore dell' IL-7



**Figure 5** Diagram showing that Janus kinase 3 (Jak3) is the major signal transducer for the common gamma chain ( $\gamma_c$ ) shared by multiple cytokine receptors. Mutations in the *IL-2RG* gene cause X-linked SCID, whereas mutations in the *Jak3* gene result in a form of autosomal recessive SCID that mimics X-SCID in lymphocyte phenotype (i.e., T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>-</sup>). Mutations in the alpha chain of the IL-7 receptor also cause SCID, but unlike X-linked and Jak3-deficient SCID, IL-7R $\alpha$  chain-deficient SCID infants have both B and NK cells (i.e., are T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup>). [Figure reprinted with permission from (27a).]

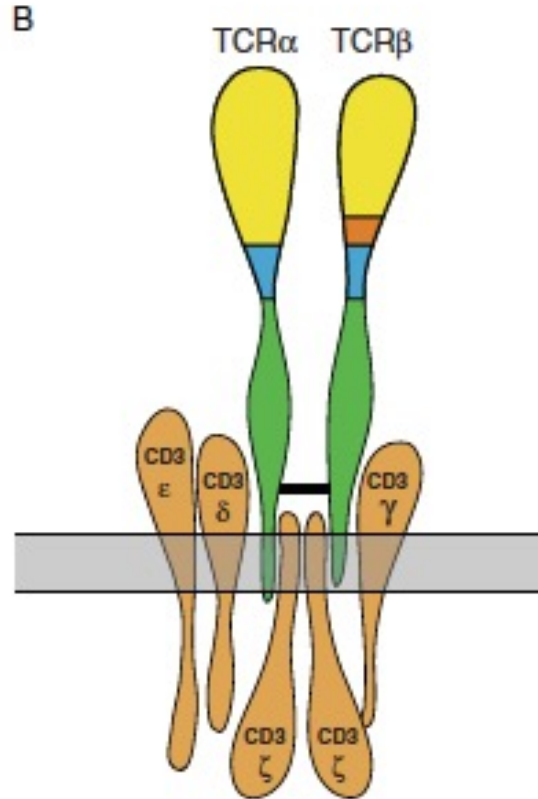
I pazienti che presentano mutazioni nella catena  $\alpha$  del recettore dell' IL-7 hanno un fenotipo T-B+NK+.

## Mutazioni della catena $\delta$ del CD3



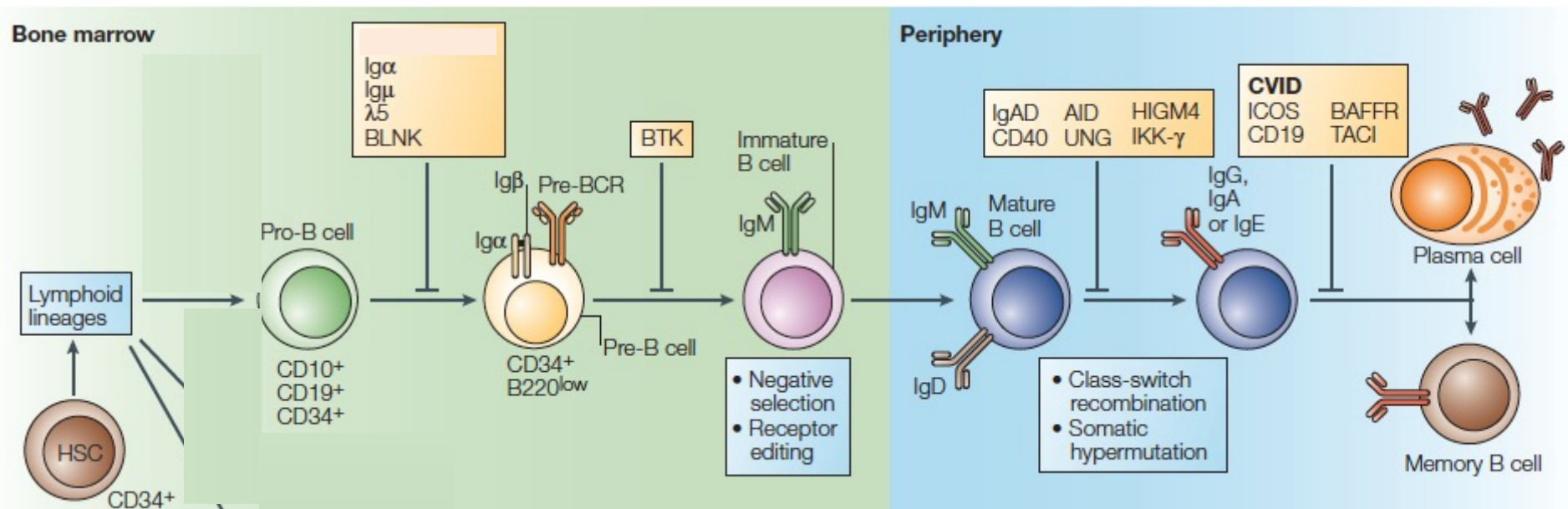
Una recente causa di SCID T-B+ $\text{NK}^+$  identificata è la mutazione nella regione extracitoplasmatica della catena  $\delta$  che determina l'assenza di linfociti T CD4 e CD8. Il fenotipo di questa SCID è uguale a quello dei pazienti con alterazione della catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-7. Il complesso CD3-TCR è costituito da un dimero  $\epsilon\gamma$ , un dimero  $\epsilon\delta$  e un omodimero  $\zeta\zeta$ .

**Anche mutazioni delle catene  $\epsilon$  e  $\zeta$  del CD3 causano SCID.**



L' assenza di una delle catene del CD3 inibisce la formazione del complesso CD3 e di conseguenza l' espressione e la segnalazione attraverso il T cell receptor.

# Immunodeficienze primarie B



Le immunodeficienze primarie B comprendono un gruppo eterogeneo di disordini accumulati dalla marcata riduzione o l'assenza di immunoglobuline nel siero.

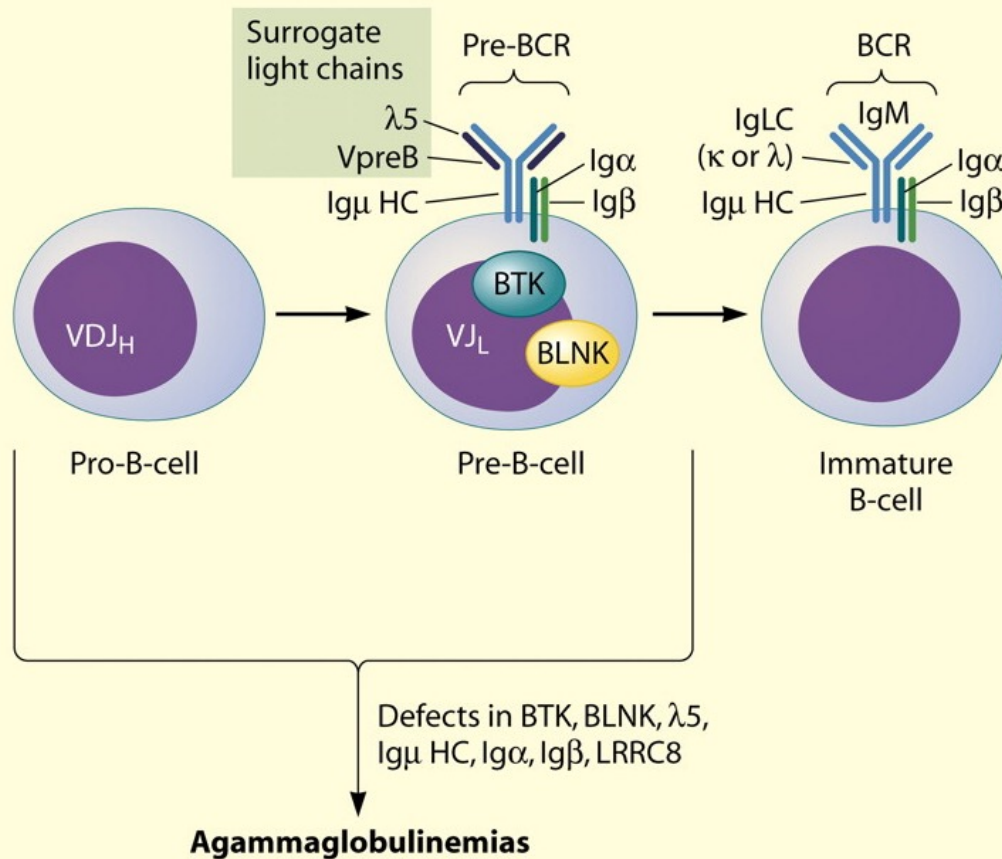
Tutte le deficienze in anticorpi sono associate ad un aumentata suscettibilità alle infezioni da parte di batteri capsulati (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) che causano bronchiti e polmoniti. Il trattamento dei pazienti con difetto degli anticorpi consiste nella somministrazione di immunoglobuline.

Le deficienze anticorpali possono essere raggruppate in 3 grandi categorie:

- i) difetti nello sviluppo dei linfociti B;
- ii) sindromi da IperIgM;
- iii) immunodeficienza comune variabile.

# Immunodeficienze causate da difetti nello sviluppo dei linfociti B

## A Antigen-independent

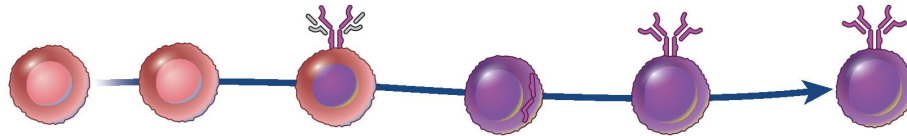


I difetti dello sviluppo dei linfociti B sono caratterizzati da una profonda ipogammaglobulinemia, una forte riduzione o assenza di linfociti B nel sangue periferico e infezioni batteriche ricorrenti nei primi 5 anni di vita.

Il blocco dello sviluppo dei linfociti B avviene prima della espressione delle Immunoglobuline complete di membrana.

Mutazioni nella tyrosin chinasi Btk sono responsabili dell'85% delle agammaglobulinemie. Circa la metà dei restanti casi sono dovuti a mutazioni in geni che codificano per componenti del pre-BCR o del BCR.

## Stadi di sviluppo dei linfociti B



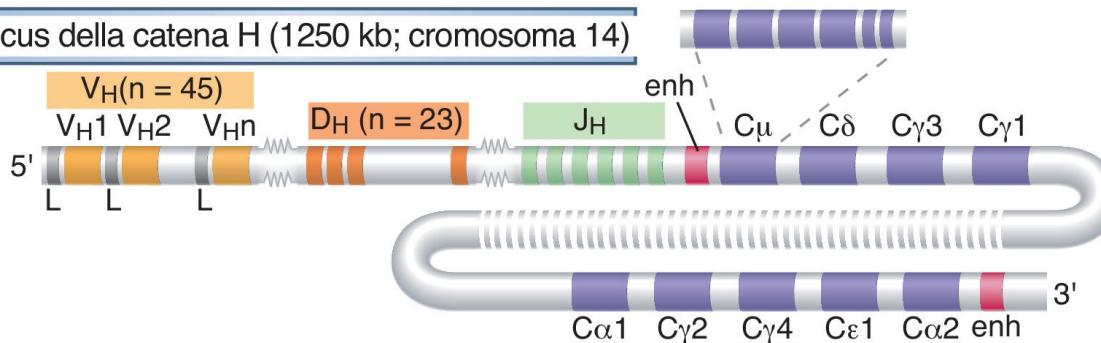
Stadio di maturazione	Cellula staminale	Linfocita pro-B	Pre-B grandi	Pre-B piccoli	Linfocita B immaturo	Linfocita B maturo
<b>Proliferazione</b>	[Barra grigia]		[Barra grigia]			
<b>Espressione di Rag</b>		[Barra grigia]		[Barra grigia]		
<b>Espressione di TdT</b>		[Barra grigia]				
<b>Ig DNA, RNA</b>	DNA della linea germinativa	DH a JH	Ricombinazione VH a DJ, mRNA per $\mu$	Gene per la catena H ricombinato (VDJ), ricombinazione V a J $\kappa$	RNA $\mu$ e $\kappa/\lambda$	Splicing alternativo dell'RNA VDJ-C a generare RNA per C $\mu$ e C $\delta$
<b>Espressione di Ig</b>	Nessuna	Nessuna	Recettore pre-B	Catena $\mu$ citoplasmatica	IgM di membrana ( $\mu$ + catena leggera $\kappa$ o $\lambda$ )	IgM e IgD di membrana
<b>Marker di superficie</b>	CD43+	CD43+ CD19+ CD10+	B220 <sup>lo</sup> CD43+	B220 <sup>lo</sup> CD43+	IgM+ CD43-	IgM <sup>hi</sup> IgD+
<b>Sito anatomico</b>	Midollo osseo					Periferia
<b>Risposta all'antigene</b>	Nessuna	Nessuna	Nessuna		Selezione negativa (delezione), editing del recettore	Attivazione (proliferazione e differenziazione)

© 2018 - Edra S.p.A.

I principali eventi che si verificano durante lo sviluppo dei linfociti B sono il riarrangiamento e l'espressione dei geni delle immunoglobuline. Gli stadi dello sviluppo dei linfociti possono essere identificati in base allo stato del riarrangiamento dei geni codificati le catene dei recettori dell'antigene (BCR e TCR). I linfociti B si sviluppano nel midollo osseo e il primo precursore orientato verso lo sviluppo B prende il nome di pro-B.

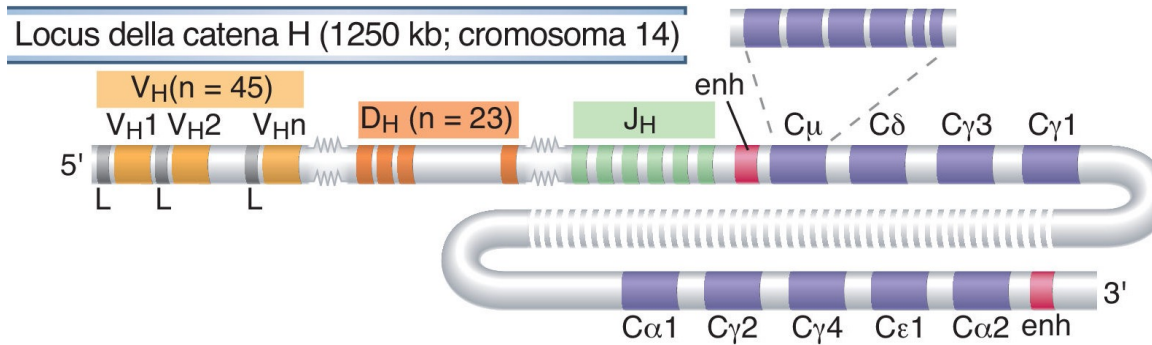
Nell'embrione umano le cellule B originano dal fegato fetale a partire dalla 7-8 settimana di gestazione, alla 12esima settimana le cellule B originano dal midollo osseo.

Locus della catena H (1250 kb; cromosoma 14)

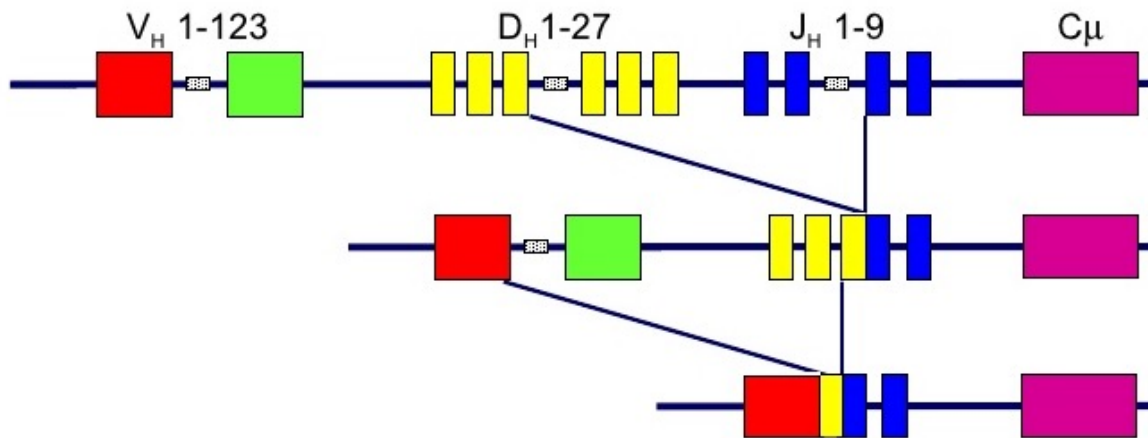




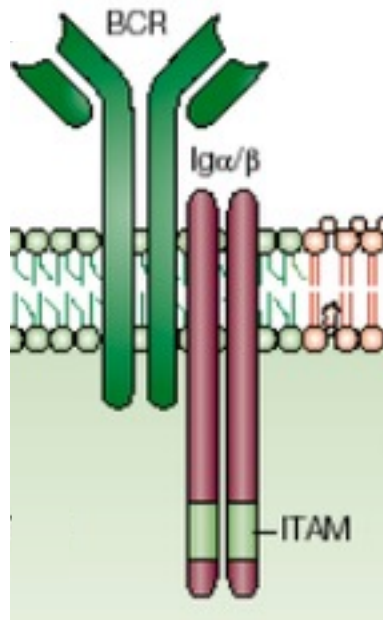
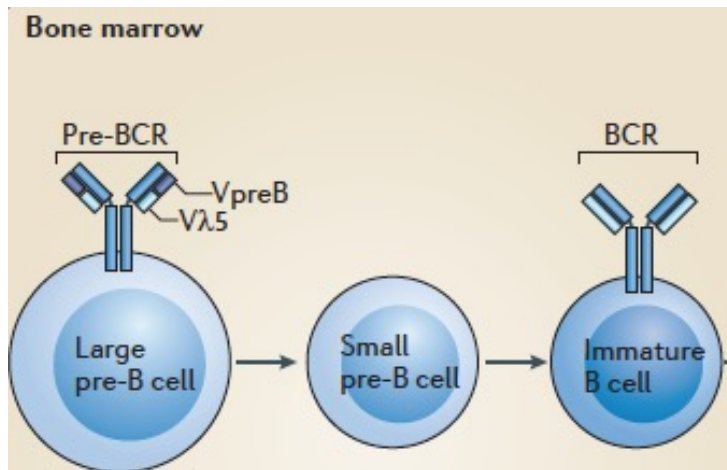
# Locus della catena pesante delle Ig



## Ig heavy chain gene rearrangement



## Sviluppo dei linfociti B



Nella fase **pro-B** iniziano ad essere espressi RAG1 e RAG2 responsabili della ricombinazione dei segmenti genici D, J della catena pesante delle Ig. Lo stadio successivo al pro-B è rappresentato dalle cellule **pre-B** che sono caratterizzate dal completo riarrangiamento di V D e J della catena pesante delle Ig che viene espressa sulla membrana cellulare e in associazione alle catene sostitutive VpreB e λ5. Tale recettore denominato pre-B si associa alle molecole Igα e Igβ che trasducono il segnale. I linfociti pre-B vanno incontro a una elevata proliferazione. L'espressione del pre-BCR oltre ad indurre la proliferazione delle cellule che hanno riarrangiato produttivamente la catena Igμ invia i segnali che mediano l'esclusione allelica. Inoltre stimola il riarrangiamento della catena leggera delle Ig e inattiva l'espressione delle catene sostitutive. In seguito al riarrangiamento della catena leggera, questa sostituirà le catene λ5 e VpreB sulla membrana cellulare e i linfociti esprimenti la IgM completa sono definiti linfociti B immaturi.



# X-linked agammaglobulinemia (XLA)

L' X-linked agammaglobulinemia è stata una fra le prime immunodeficienze descritte.

Nel 1952 Bruton riporta il caso di un bambino di 8 anni con ricorrenti infezioni batteriche ed assenza della frazione delle globuline nel siero.

Questa osservazione fu fatta sulla base di due nuove acquisizioni scientifiche:

-L' applicazione della tecnica dell' elettroforesi sulle proteine seriche insieme all' identificazione che gli anticorpi corrispondevano alla frazione delle globuline.

-L' utilizzo degli antibiotici (1940)

Il bambino descritto da Bruton fu trattato con somministrazione sottocutanea mensile di gammaglobuline.

-L'analisi di altri casi di bambini affetti da agammaglobulinemia avevano dimostrato che questa colpiva maggiormente i maschi e aveva un pattern di trasmissione X-linked.

# Mutazioni della Bruton's tyrosine kinase causano XLA

Nel 1970 è stato dimostrato che i pazienti affetti da X-linked agammaglobulinemia mostravano una forte riduzione nel numero di linfociti B circolanti. Nel 1993 due gruppi contemporaneamente riportarono l'identificazione del gene responsabile della XLA rivelando che esso codificava per una chinasi citoplasmatica ed era localizzato sul cromosoma X. Questa chinasi fu denominata Bruton's Tyrosin kinase (BTK)

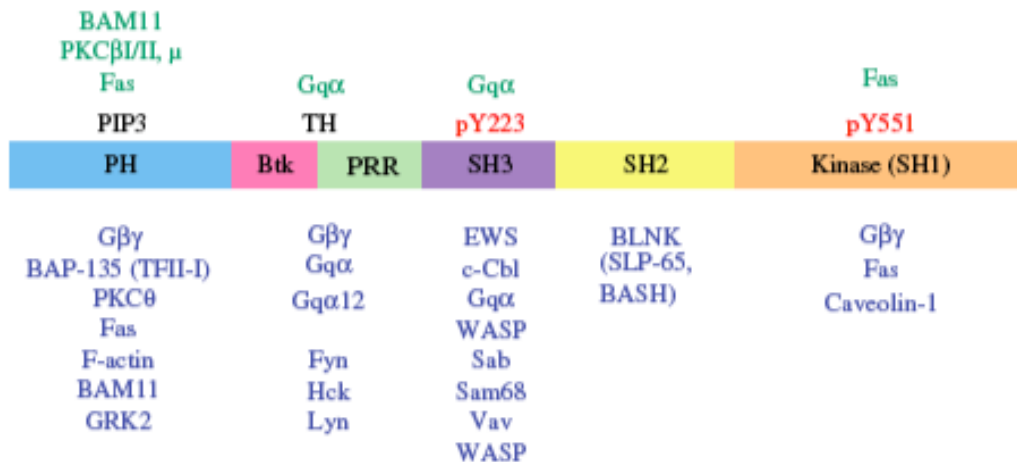
Btk appartiene alla famiglia di tirosin chinasi citoplasmatiche chiamate Tec chinasi che include Tec, Itk, Rlk e Bmx.

Le Tec chinasi sono espresse principalmente nelle cellule di origine ematopoietica. Le cellule B e le piastrine esprimono Btk e Tec;

le cellule T esprimono Itk Rlk e Tec

le cellule mieloidi inclusi i mastociti esprimono Btk, Tec Itk e Rlk.

In vivo

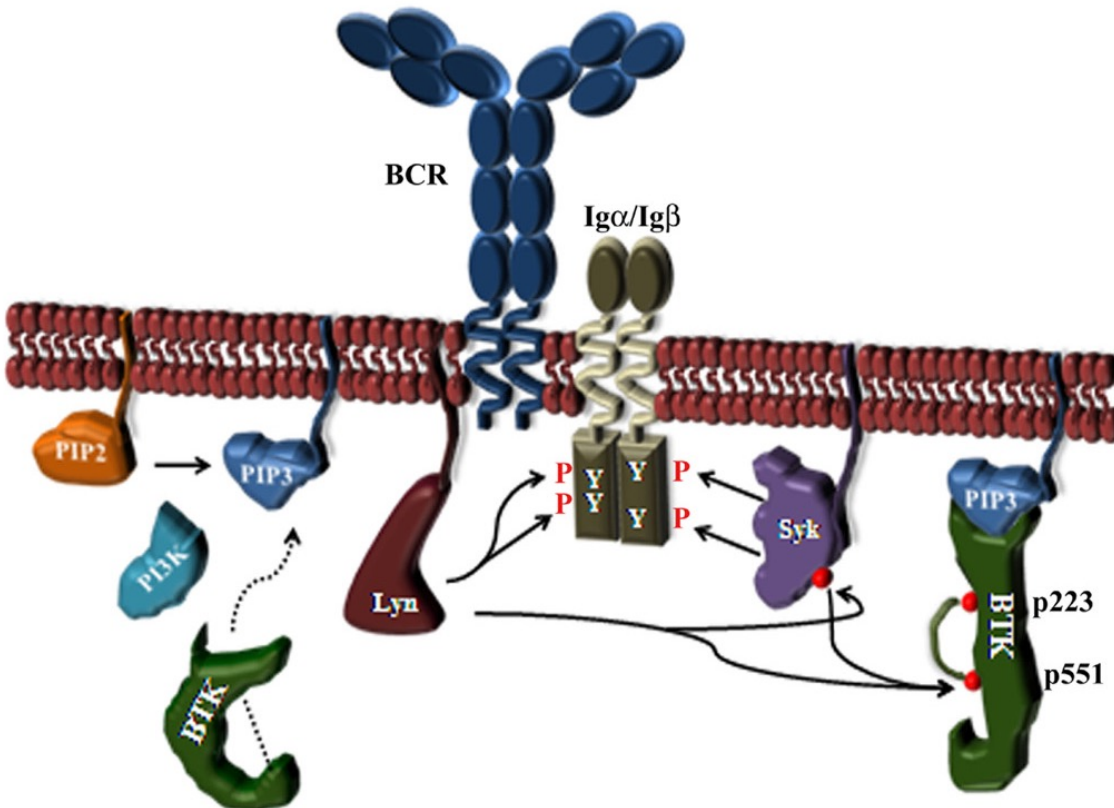


In vitro

Btk presenta nella regione NH-terminale il dominio PH (omologo della plecstrina) che rende possibile l'associazione tra BTK e il fosfatidil inositolo-3, 4, 5-trifosfato (PIP3) generato dalla PI3K.

I domini TH (prolin rich TEC homology domain), SH2 e SH3 di interazione con altre proteine. Nella regione COOH terminale il dominio chinasi.

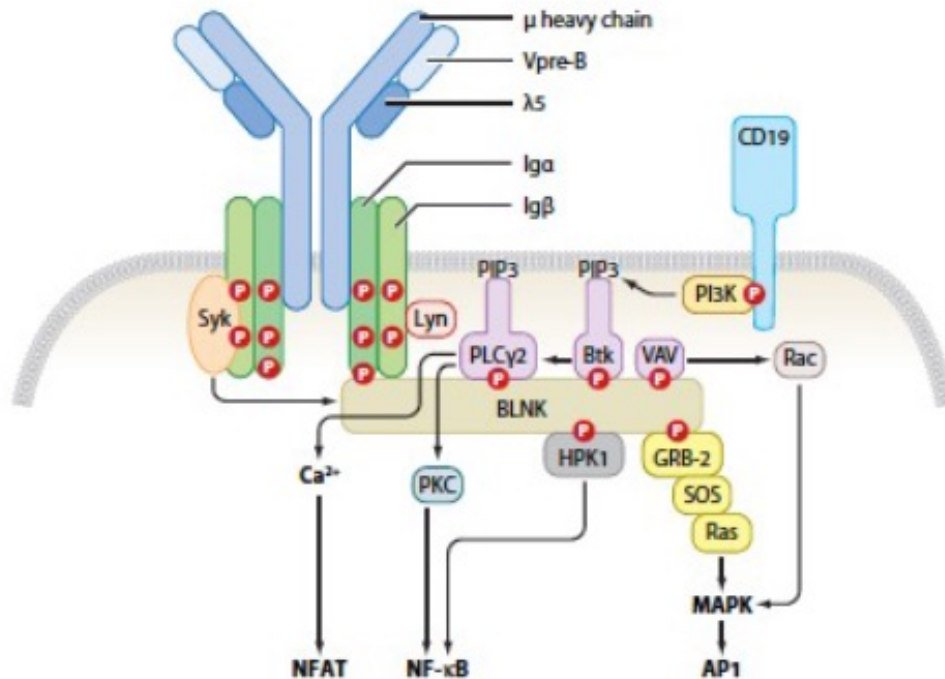
**B**



Btk è espressa durante lo sviluppo delle cellule B dallo stadio pro-B fino allo stadio maturo. In seguito ad attivazione Btk trasloca alla membrana plasmatica attraverso l'interazione fra il dominio PH con il PIP3.



# BTK è necessaria per la segnalazione inviata dal pre-BCR

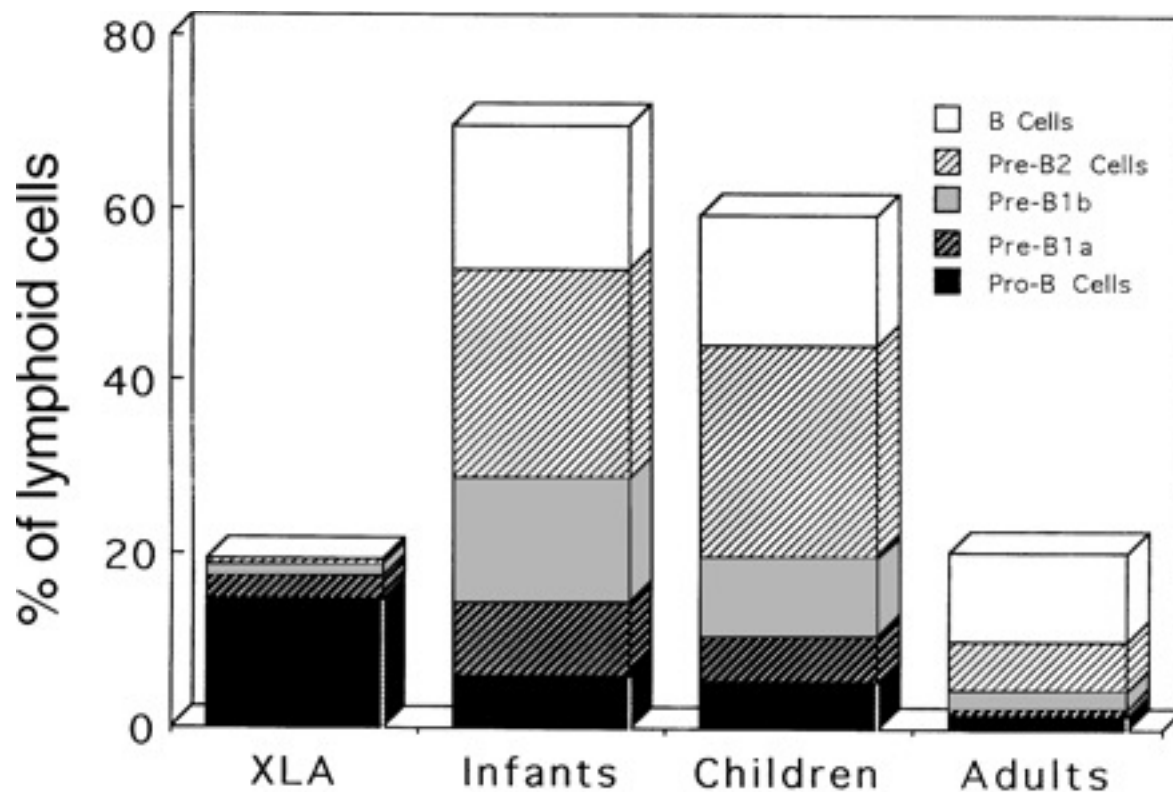


La segnalazione inviata dal pre-BCR è simile a quella inviata dal BCR.

La chinasi Btk è attivata a valle del pre-BCR ed è necessaria per la sopravvivenza e l'espansione dei linfociti B oltre lo stadio pre-B. La segnalazione da parte di questo recettore è essenziale per la proliferazione dei linfociti pre-B che hanno riarrangiato produttivamente la catena  $\mu$  delle immunoglobuline.

La segnalazione da parte del pre-BCR sembra essere iniziata in modo ligando indipendente.

## Frequenze relative di cellule ai diversi stadi di sviluppo B

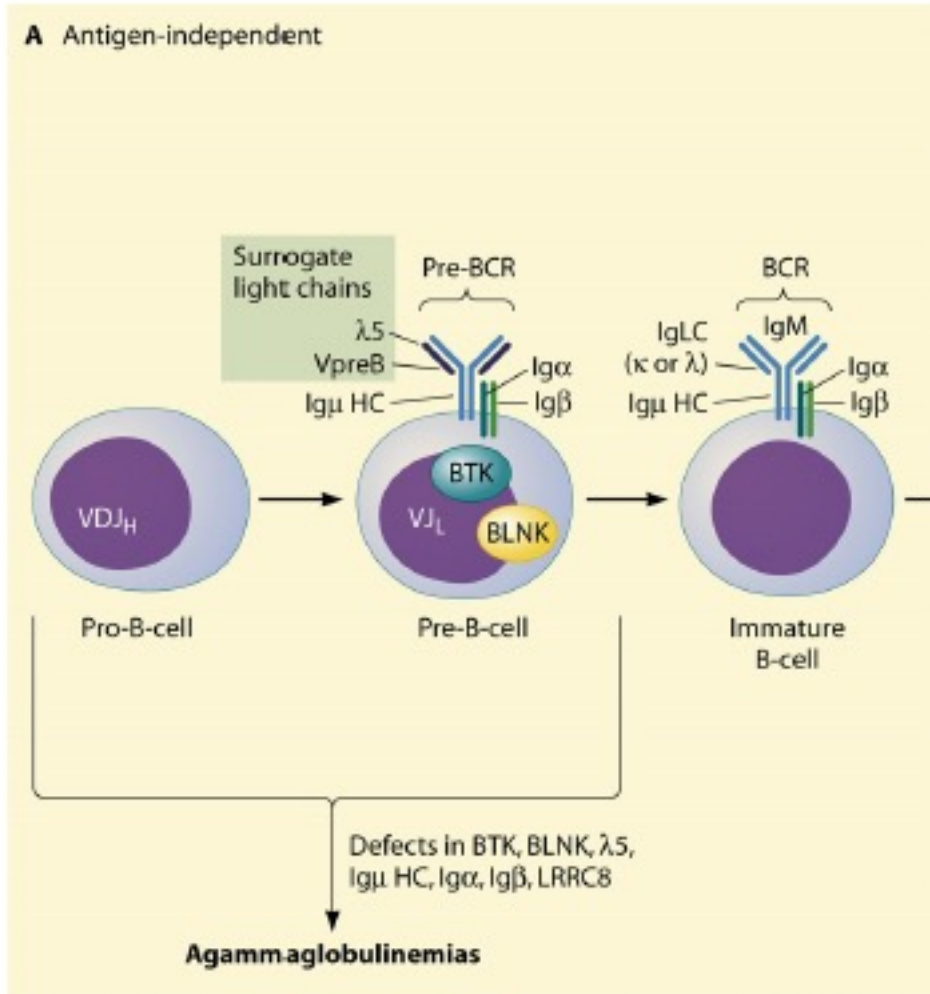


Lo studio dei precursori delle cellule B nel midollo dei pazienti affetti da XLA ha dimostrato una forte riduzione delle cellule pre-B e delle cellule esprimenti le Ig complete associato ad un aumento delle cellule pro-B (CD19+, TdT+, CD34+). Ciò determina un aumento del rapporto delle cellule proB/ preB. In circolo i pazienti XLA presentano pochi linfociti B.

Nei bambini normali fra il 10% e il 25% delle cellule CD19+ del midollo sono rappresentate da linfociti proB mentre il 35-60% è rappresentato da cellule pre-B.



## Agammaglobulinemie autosomiche recessive



Non tutti i pazienti con profonda ipogammaglobulinemia, riduzione o assenza di linfociti B e infezioni nei primi mesi di vita sono maschi con difetti in Btk. Già negli anni '70 era stato dimostrato che circa un 10% di femmine presentavano un fenotipo XLA. Tali pazienti manifestavano precocemente la malattia, presentavano meno dell'1% dei normali valori di cellule B in circolo e una profonda agammaglobulinemia.

Mutazioni nella catena  $\mu$  delle Ig, di Ig $\alpha$ , BLNK (SLP65) e  $\lambda$ <sub>5</sub> causano agammaglobulinemie.

Difetti nelle fasi precoci dello sviluppo dei linfociti B sono associati a:

- infezioni batteriche ricorrenti nei primi 5 anni di vita
- profonda ipogammaglobulinemia
- forte riduzione o assenza di linfociti B circolanti

## Agammaglobulinemie recessive autosomiche

L' 85% dei difetti dello sviluppo B sono dovuti a mutazioni in Btk, 5% hanno mutazioni nella catena  $\mu$ , una minoranza mutazioni in  $\lambda 5$  Ig $\alpha$  o BLNK. I pazienti con mutazioni della catena  $\mu$  delle Ig tendono ad avere un fenotipo più grave dei pazienti con mutazioni in Btk.

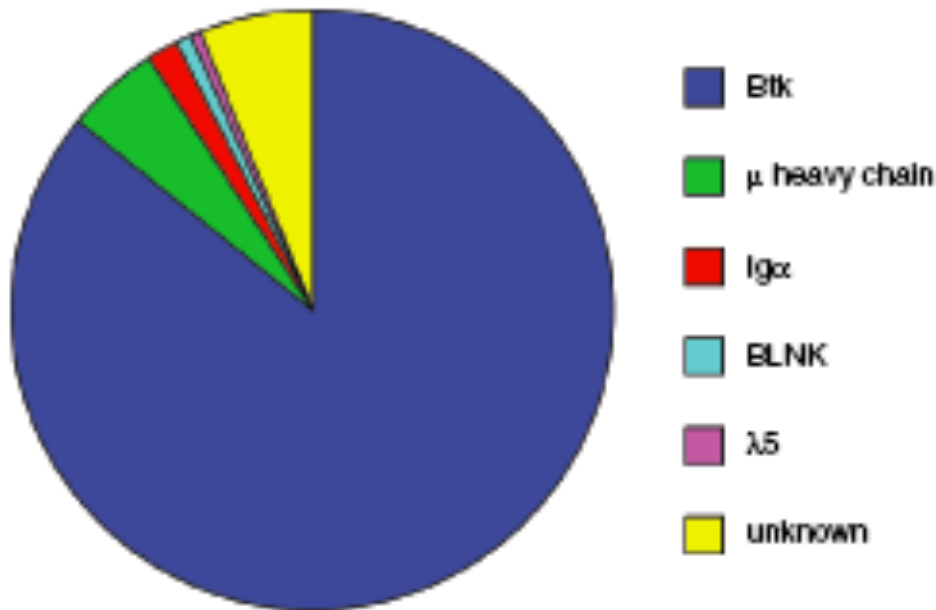


Fig. 2. The distribution of genetic defects in patients with inherited disorders of early B-cell development.



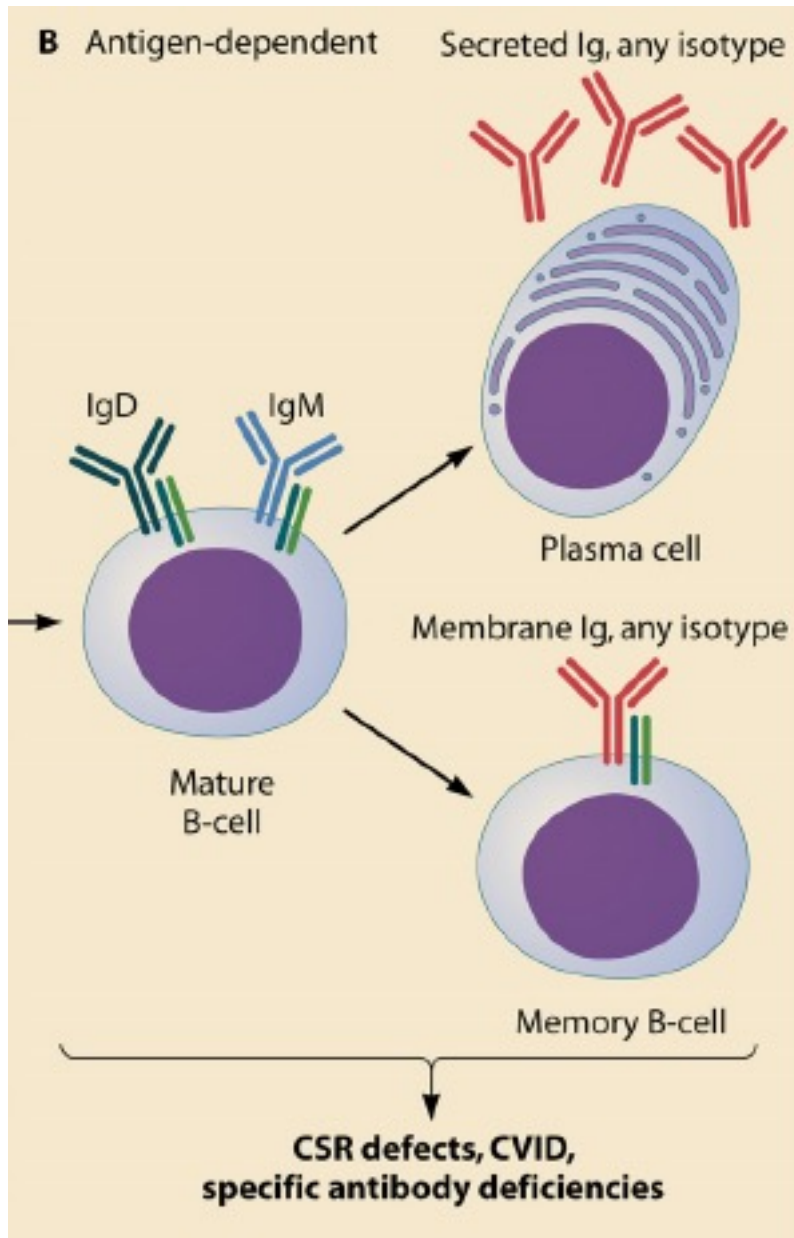
# Trattamento delle XLA

Prima della identificazione da parte di Bruton della XLA i pazienti affetti da questa immunodeficienza morivano di infezioni croniche o acute. Fra gli anni '50-'70 l'introduzione della somministrazione intramuscolare di gammaglobuline che assicurava una bassa concentrazione di IgG faceva sì che la maggior parte dei pazienti moriva prima dell'età adulta a causa di infezioni acute, polmoniti, infezioni da enterovirus. A partire dagli anni '80 la terapia delle XLA viene effettuata mediante trasferimento delle IgG per via endovenosa o sottocutanea associata a somministrazione di antibiotici. Questo trattamento ha notevolmente aumentato l'età media di sopravvivenza di questi pazienti.

Dal punto di vista clinico i pazienti con agammaglobulinemia autosomica recessiva non sono distinguibili dai pazienti XLA. Anche in questo caso esiste una notevole variabilità nella gravità delle infezioni. I pazienti con mutazioni nella catena pesante delle immunoglobuline,  $Ig\alpha$  e BLNK presentano infezioni da *Pseudomonas* e Stafilococco, neutropenia suggerendo che l'ipogammaglobulinemia è la causa dell'aumentata suscettibilità alle infezioni.

La terapia in questi pazienti è la somministrazione di immunoglobuline associata a trattamento antibiotico.

# Immunodeficienze anticorpali da difetti funzionali delle cellule B



Questo gruppo di immunodeficienze sono causate da difetti nella attivazione e nella produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Queste immunodeficienze includono:  
i) la sindrome da IperIgM,  
ii) l'immunodeficienza comune variabile.

# Sindrome da iperIgM

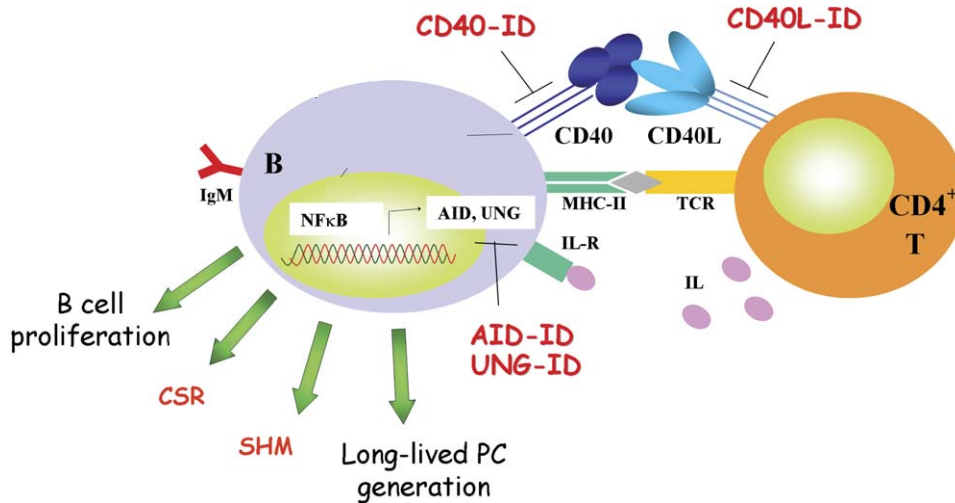
Sindrome da iperIgM= questa sindrome include un gruppo eterogeneo di immunodeficienze primarie caratterizzate da livelli serici bassi o assenti di IgG, IgA, IgE, ma normali o elevati livelli di IgM. I pazienti affetti da questa sindrome sono suscettibili ad infezioni polmonari e opportunistiche. L'iperIgM è causata da difetti nella commutazione di classe delle immunoglobuline da IgM/IgD a IgG, IgA o Ig E.

**Table 1. Immunological features of CD40-deficient patients at diagnosis**

	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	CD3 (%)	CD19 (%)	PHA (cpm × 10 <sup>3</sup> )
Patient 1	180	<6.6	81	73	16	124
Patient 2	120	<6.6	400	75	19	122
Patient 3	135	<6.6	200	76	20	138
Patient 4	<150	<6.6	80	56	35	126
n.v.	351-1916	17-178	48-347	71 ± 7	18 ± 6	116-188

Ig, immunoglobulin; PHA, phytohemagglutinin n.v., normal values.

## Cause molecolari delle IperIgM



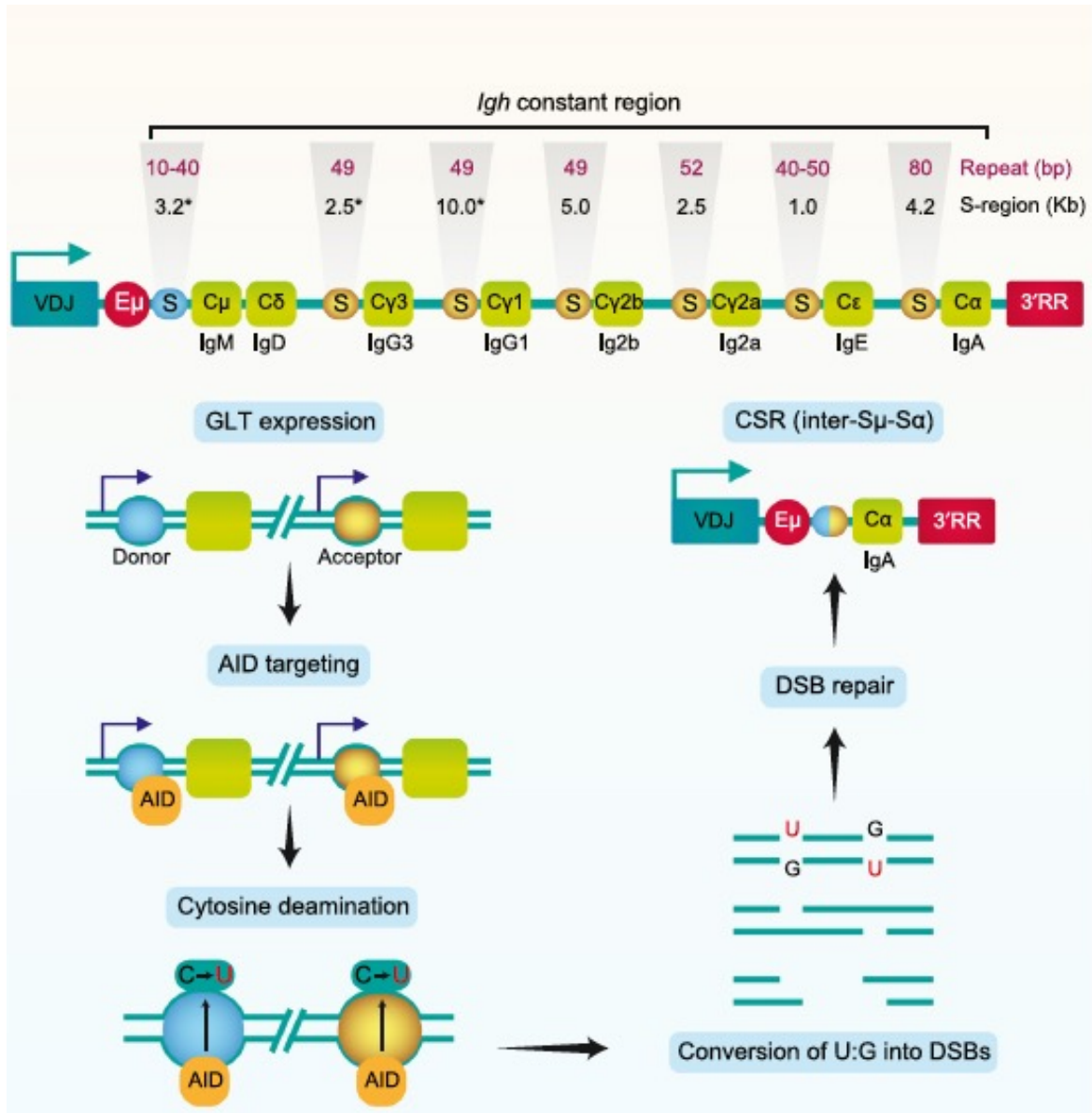
La sindrome da iperIgM/difetto di commutazione di classe è causata da difetti nella interazione fra CD40 e CD40L alla via attivata da tale interazione.

I pazienti con IperIgM possono avere: **difetto nel CD40**, molecola di 50-kDa appartenente alla famiglia dei recettori del TNF- $\alpha$  (AR-HIGM) espressa dai linfociti B.

- **difetto nel ligando del CD40 (CD40L, gp39)** che è una proteina omologa al Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) transientemente espressa dai linfociti T attivati. Disordine X-linked (X-HIGM)

- **difetti in enzimi che sono coinvolti nella generazione o nel riparo delle rotture del doppio filamento di DNA durante la commutazione di classe delle Immunoglobuline (activation induced deaminase, uracil-N-glicosilasi).**

# Meccanismo molecolare delle commutazione di classe



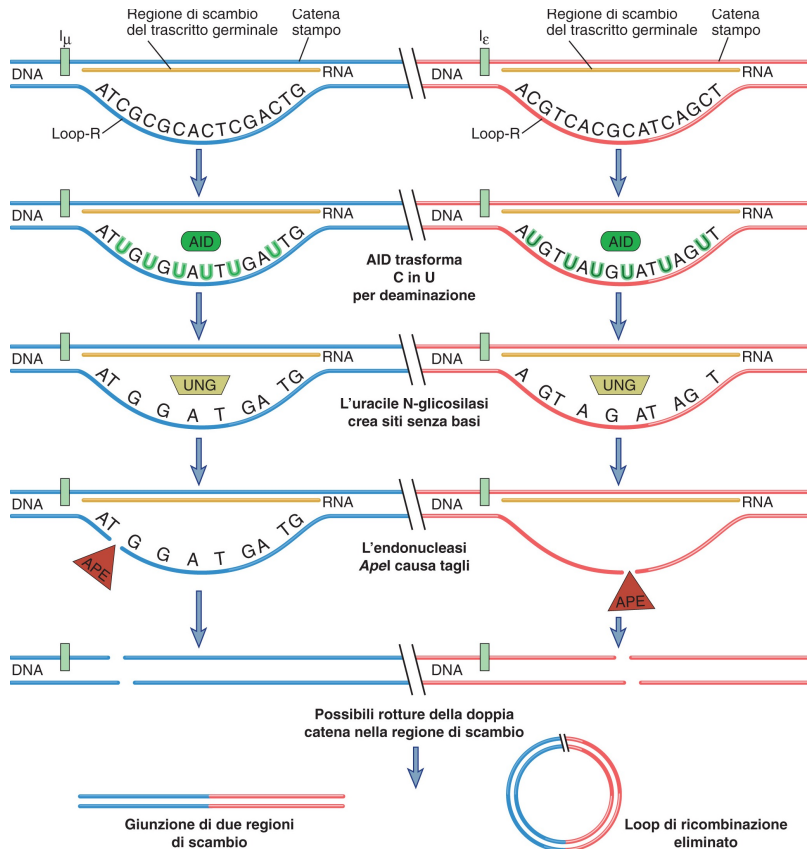
A livello molecolare la commutazione di classe è una reazione di ricombinazione fra le sequenze di switch localizzate al 5' di ogni gene codificante la regione costante della catena pesante delle Ig.

Questo meccanismo procede attraverso la generazione e la riparazione di rotture del doppio filamento di DNA nelle regioni di switch a livello del locus delle catene pesanti (*Igh*). Questo processo richiede la trascrizione delle sequenze I-S-C che avviene in presenza di specifiche citochine e l'espressione della citidin deaminasi indotta dall'attivazione (AID: activation induced deaminase).

GLT: germline transcription

CSR: class switch recombination

# Introduzione delle rotture del doppio filamento del DNA da parte di AID



I trascritti germinali si appaiano al filamento di DNA codificante lasciando l'altro filamento di DNA libero.

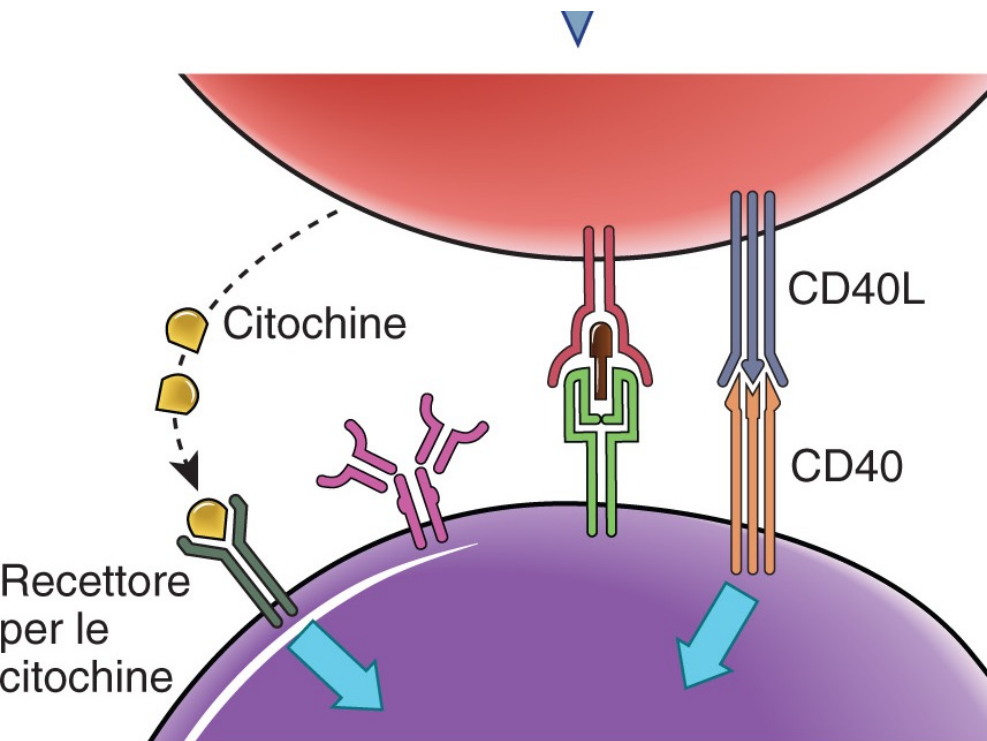
Activation induced deaminasi (AID) converte la citosina in uracile.

L'uracil-N-glicosilasi crea siti abasici (UNG)

L'endonucleasi Ape genera dei tagli nel DNA.

I tagli del doppio filamento di DNA sono riparati dagli stessi sistemi di riparo attivati da agenti che causano rotture del doppio filamento di DNA (es: radiazioni ionizzanti) che includono il non homologous end joining)

# L'espressione di AID nei linfociti B è promossa dall'interazione CD40-CD40L



Attivazione dei linfociti B da parte delle citochine e del ligando di CD40;

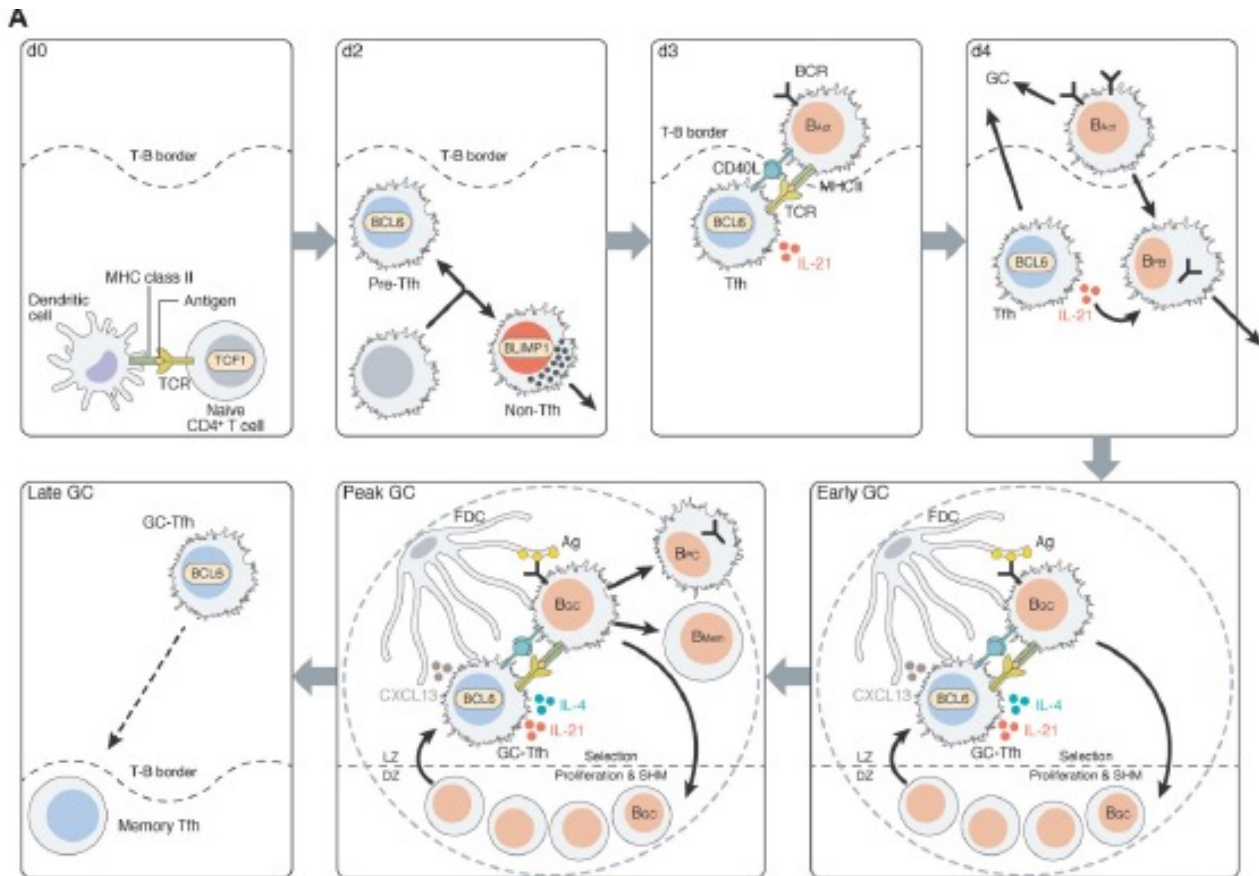
Lil

Il CD40 è espresso costitutivamente dai linfociti B mentre il suo ligando CD40L (omologo al  $\text{TNF-}\alpha$ ) è espresso dai linfociti T attivati. **L'interazione CD40-CD40L stimola la proliferazione dei linfociti B, aumenta la sintesi delle Ig e induce l'espressione dell'enzima activation induced deaminase (AID).** La segnalazione inviata dal CD40 e dalle diverse citochine induce la commutazione di classe verso specifici isotipi.

I linfociti T specializzati nell'aiutare i linfociti B (T cell help to B cells) sono i linfociti helper follicolari (Tfh) caratterizzati dall'espressione del fattore trascrizionale BCL6. I Tfh risiedono nei linfonodi e nella milza.

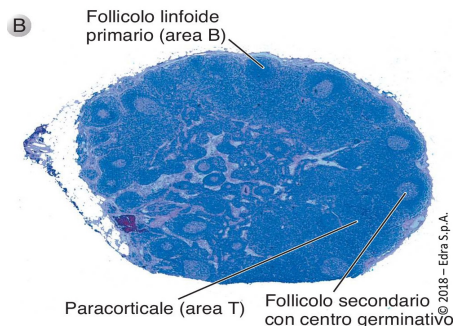
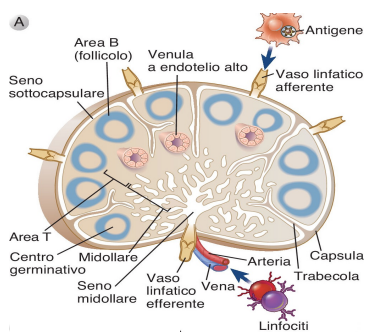


## Cinetica e interazioni della risposta B



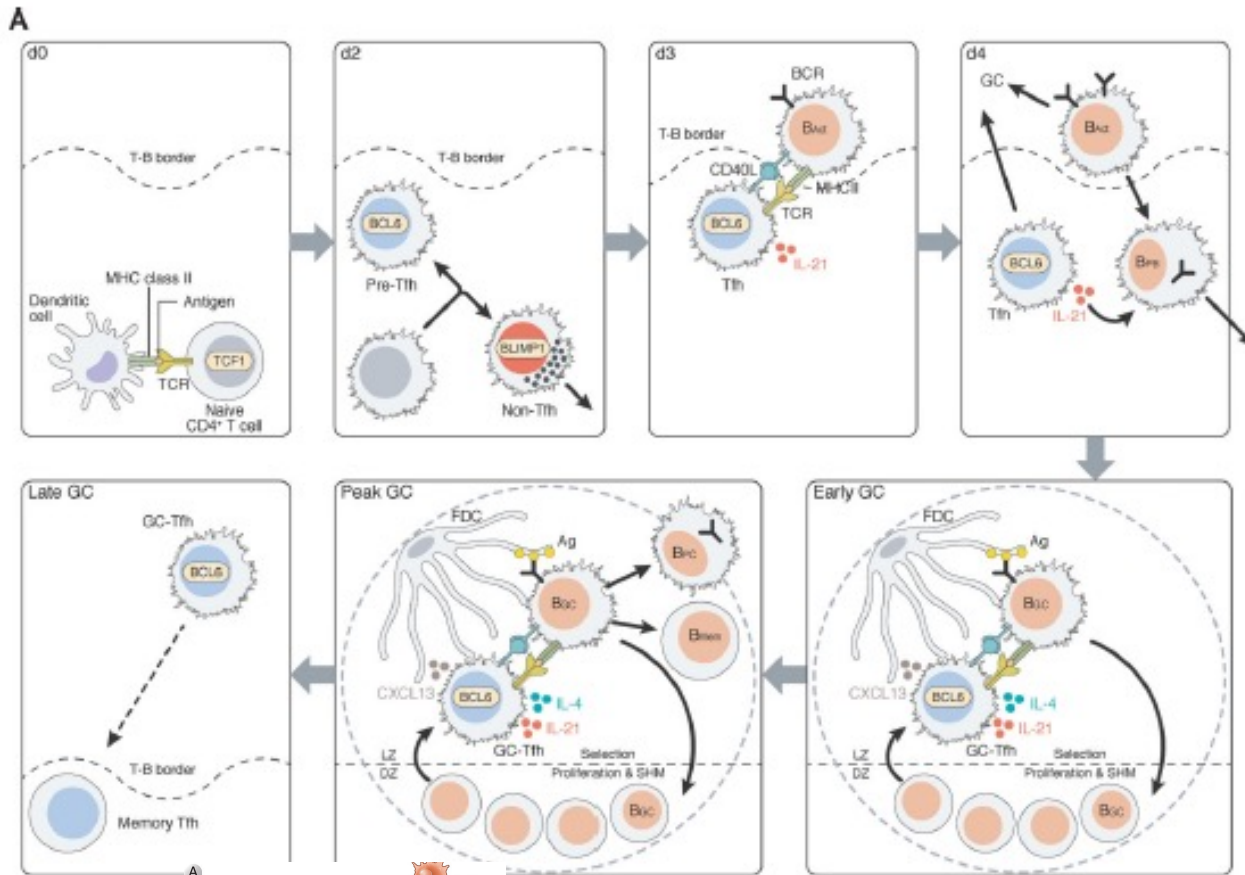
La risposta anticorpale T dipendente agli antigeni proteici prevede la cooperazione fra linfociti Tfh e linfociti B. Negli organi linfoidi secondari il riconoscimento dell'antigene presentato dalle DC induce il differenziamento dei linfociti T CD4+ naive in pre-Tfh nella zona T.

In parallelo nella zona B dell'organo linfoide secondario i linfociti B riconoscono l'antigene e agiscono da cellule presentanti l'antigene ai pre-Tfh nella zona di confine fra zona T e B dell'organo linfoide secondario.





## Cinetica e interazioni della risposta B



I Tfh forniscono ai linfociti B l'IL-21 e la stimolazione del CD40 da parte del CD40L per la proliferazione e il differenziamento dei linfociti B del centro germinativo (GC) e extrafollicolari.

I linfociti B extrafollicolari differenzieranno in plasmacellule a bassa sopravvivenza. Possono effettuare switch isotipico.

I linfociti B del centro germinativo (GC) migreranno all'interno del follicolo dove prolifereranno dando origine al centro germinativo.

Nel CG i linfociti B differenziano in plasmacellule a lunga sopravvivenza e linfociti B della memoria e possono effettuare switch isotipico e l'ipermutazione somatica.

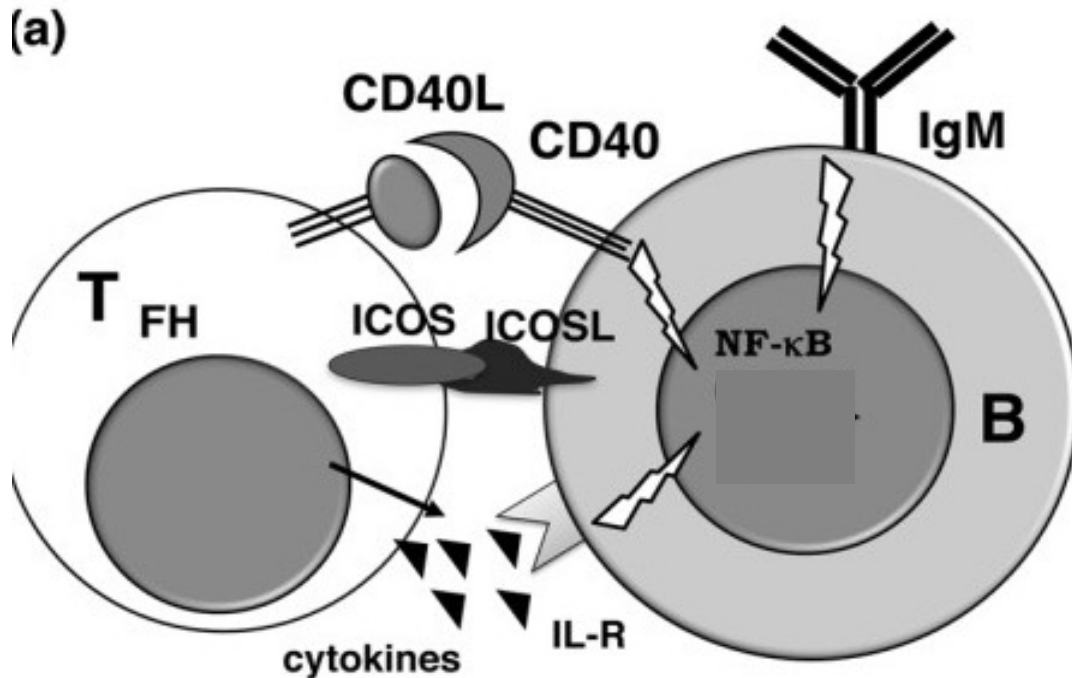
## Sindrome da IperIgM causata da difetti nella interazione CD40-CD40L

Alterazioni nella segnalazione del CD40 o la mancata interazione con il CD40L sono alla base della sindrome da IperIgM.

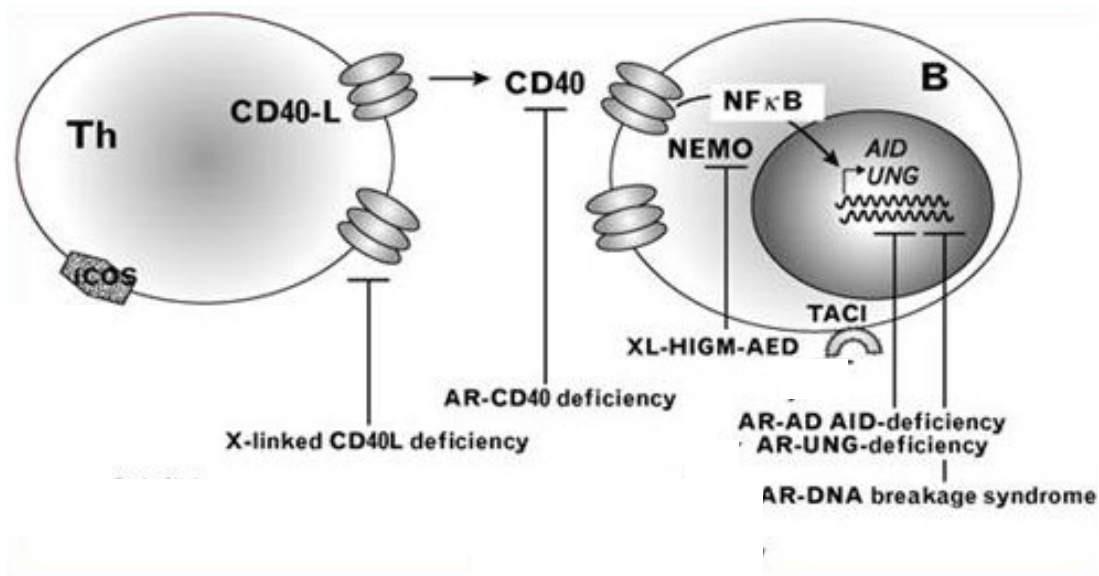
Mutazioni o delezioni nel ligando del CD40 causano X-HIGM.

Una forma autosomica recessiva di IperIgM (AR-HIGM) con un fenotipo simile alla X-HIGM è causata da difetti nel CD40.

I pazienti affetti da X-HIGM e da difetti del CD40 non presentano centri germinativi nella milza e nei linfonodi e sono soggetti a infezioni opportunistiche (Pneumocystis Carinii, Cytomegalovirus)



# Sindrome da IperIgM causate da difetti di enzimi coinvolti nella generazione o nel riparo delle rotture del doppio filamento di DNA durante la commutazione di classe delle Immunoglobuline.



Approssimativamente 10-15% dei pazienti con difetti nella commutazione di classe delle Ig presentano **mutazioni nell'enzima AID**. In tali pazienti la diagnosi viene effettuata nei primi 5 anni di vita. Questi pazienti presentano linfonodi giganti e la sindrome può essere sia autosomica dominante che recessiva.

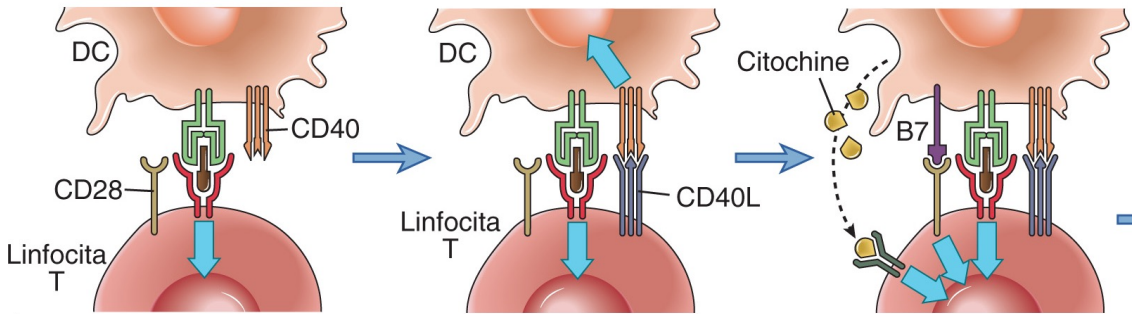
**Mutazioni nell'enzima UNG** sono state documentate in un ristretto numero di pazienti affetti da IperIgM clinicamente simili ai pazienti con mutazioni in AID. Anche questi pazienti mostrano centri germinativi molto sviluppati.

## Ruolo del CD40 nella attivazione dei linfociti T

Il riconoscimento dell'antigene (in presenza o in assenza delle molecole costimolatorie B7) determina l'espressione di CD40L sul linfocita T

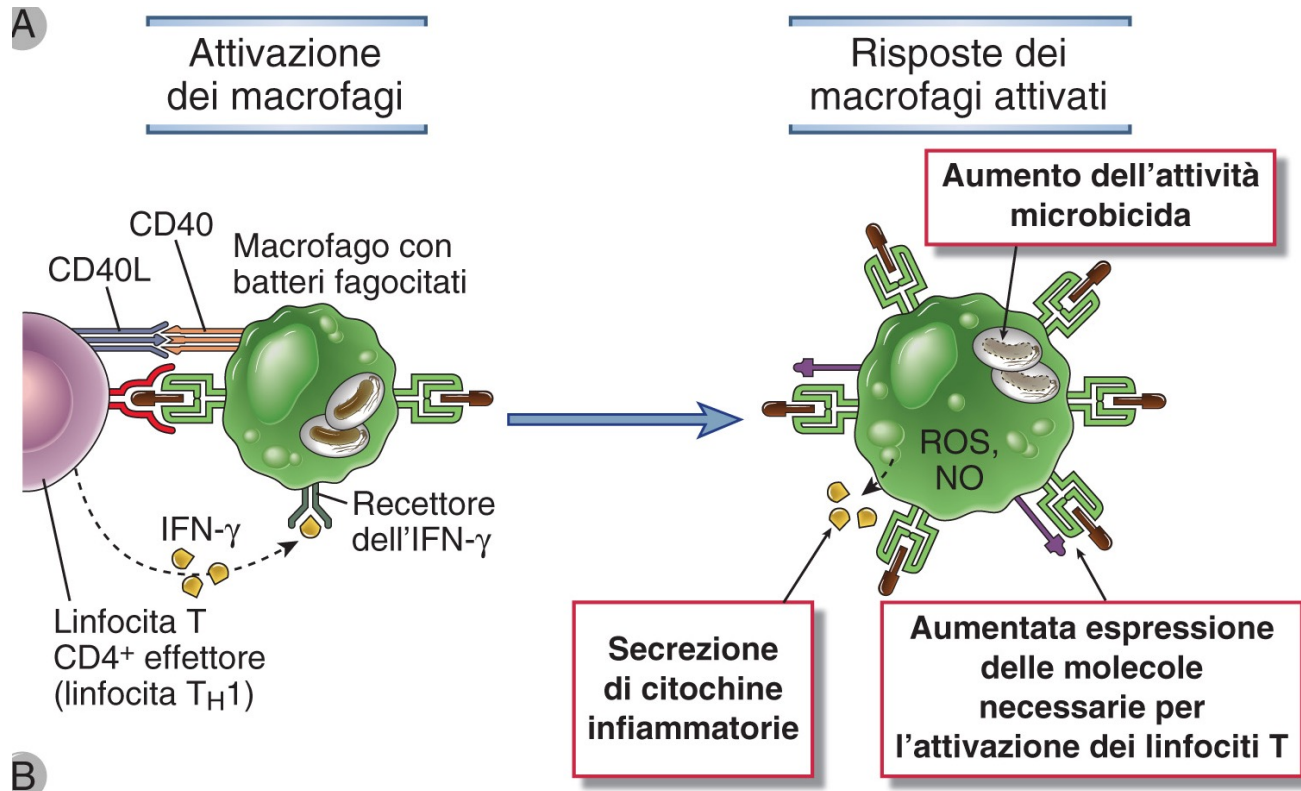
CD40L lega CD40 sulla DC; ciò causa l'espressione di B7 sulla DC e la secrezione di citochine

Le DC attivate stimolano la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T



I pazienti affetti da difetti del CD40 o CD40L mostrano una aumentata suscettibilità alle infezioni opportunistiche (Pneumocystis carinii, Criptosporidium). Tali infezioni sono rare nelle immunodeficienze strettamente umorali ma presenti in quelle T. L'interazione CD40-CD40L attiva le cellule presentanti l'antigene aumentando l'espressione di B7 e dell'IL-12.

# Ruolo del CD40 nell'attivazione dei macrofagi



L'interazione del CD40 espresso dai macrofagi con il CD40L attiva i macrofagi potenziando la loro capacità battericida.

# Terapia delle HIGM

Tutte le forme di iperIgM richiedono la somministrazione di Immunoglobuline per via intravenosa o sottocutanea che riduce la frequenza e gravità delle infezioni.

Il trapianto di cellule staminali può curare la X-HIGM e la forma causata da difetti del CD40. I risultati di 38 trapianti effettuati in Europa hanno dimostrato la guarigione del 58% dei trapiantati mentre il 32% non sono sopravvissuti a causa di infezioni o di GVHD.

Per questo si sta cercando di valutare a lungo termine i rischi e i benefici del trapianto di cellule staminali rispetto alla terapia con le Ig

# Immunodeficienza comune variabile

Le common variable immunodeficiency (CVID) includono un gruppo eterogeneo di disordini. I pazienti affetti da tale malattia sono affetti da frequenti infezioni dopo i dieci anni di vita. Questi presentano valori normali o bassi di IgM e bassi livelli di IgG e IgA. Il numero di cellule B nel sangue è normale, ma in alcuni casi può essere molto basso. La maggior parte dei pazienti presentano una forte riduzione delle cellule B della memoria e la maggiore caratteristica è rappresentata da difetti nella generazione delle plasma cellule. Tale disordine si accompagna a manifestazioni auto immuni.

Le cause genetiche di tale sindrome non sono state definite. Le cause di questo disordine potrebbero essere dovute a anomalie dei linfociti B o anomalie dei linfociti T helper.

Mutazioni in ICOS e CD19 sono state osservate in una minoranza di individui affetti da CVID. ICOS è necessario per la generazione dei linfociti T helper follicolari.

## Testi per il modulo di Immunopatologia del Corso di Patologia Molecolare e Immunopatologia

Immunologia cellulare e molecolare A. K. Abbas, A, H. Lichtman, S. Pilai nona edizione Elsevier

Ipersensibilità immediata

Immunologia dei trapianti

Immunodeficienze congenite

Malattie mediate da anticorpi

Risposte anticorpali agli antigeni T dipendenti

Complemento

Review:

The development of allergic inflammation. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. 2008. 454: 445-54.

Asthma and allergic inflammation. Locksley RM. Cell. 2010 140:777-83.

Hemolytic Transfusion Reactions. Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. N Engl J Med. 2019 Jul 11;381(2):150-162. doi: 10.1056/NEJMra1802338.

Antibody mediated organ allograft rejection R. B. Colvin and R. N. Smith. Nat Rev. immunol 2005; 5:807-817

Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. Valenzuela NM, Reed EF. J Clin Invest. 2017; 127:2492-2504

Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. Buckley R.H. Annu. Rev. Immunol 2004. 22: 625-655

Severe combined immunodeficiencies and related disorders. Fischer A et al. Nat Rev Dis Primers. 2015 1:15061. doi: 10.1038/nrdp.2015.61

T cell allorecognition and transplant rejection a summary and update. Heeger PS. Am. J. Transplant 2003.3:525-33

Primary B cell immunodeficiency: comparison and contrasts. Conley M.E. et al. Ann. Rev. immunol. 2009. 27:199-277.