

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.

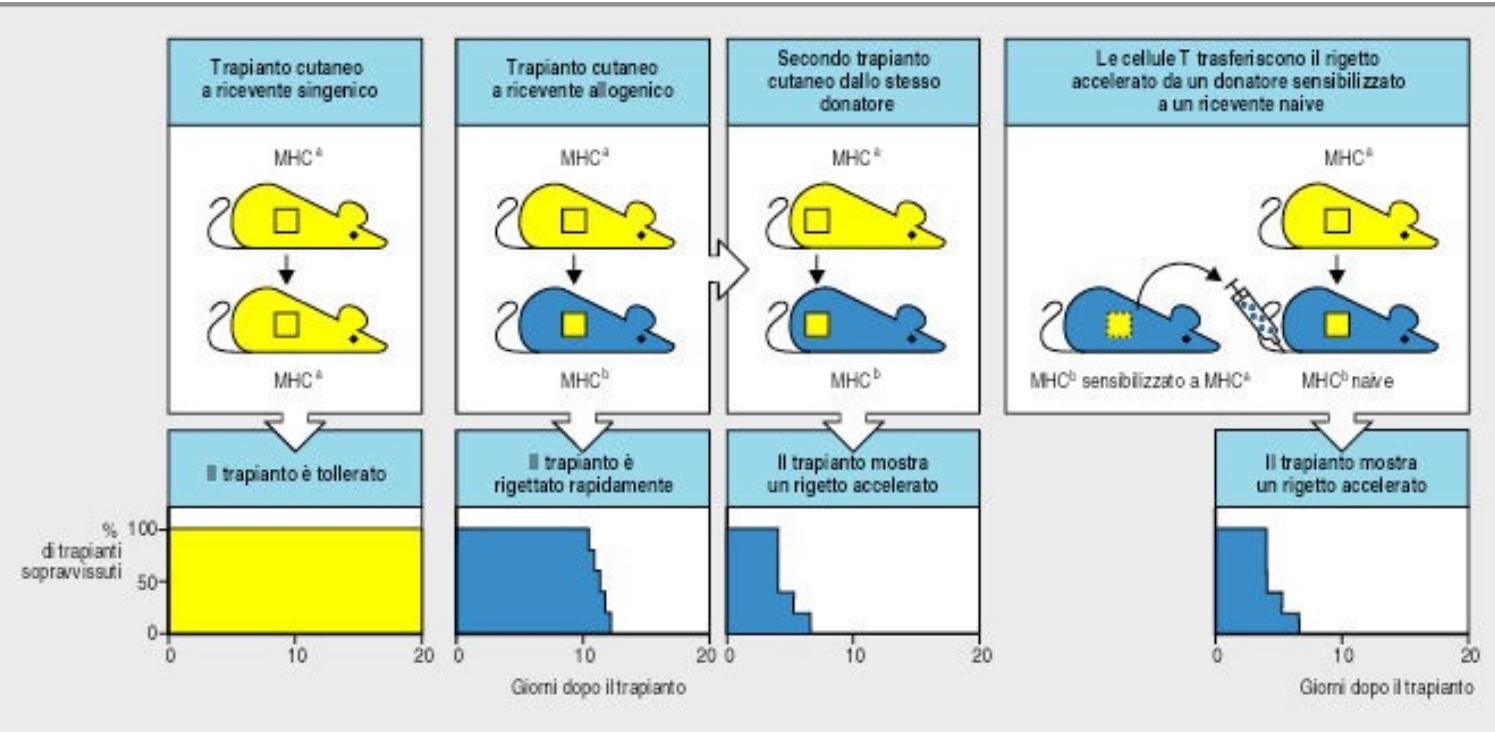
Trapianto fra due individui geneticamente identici: trapianto singenico

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



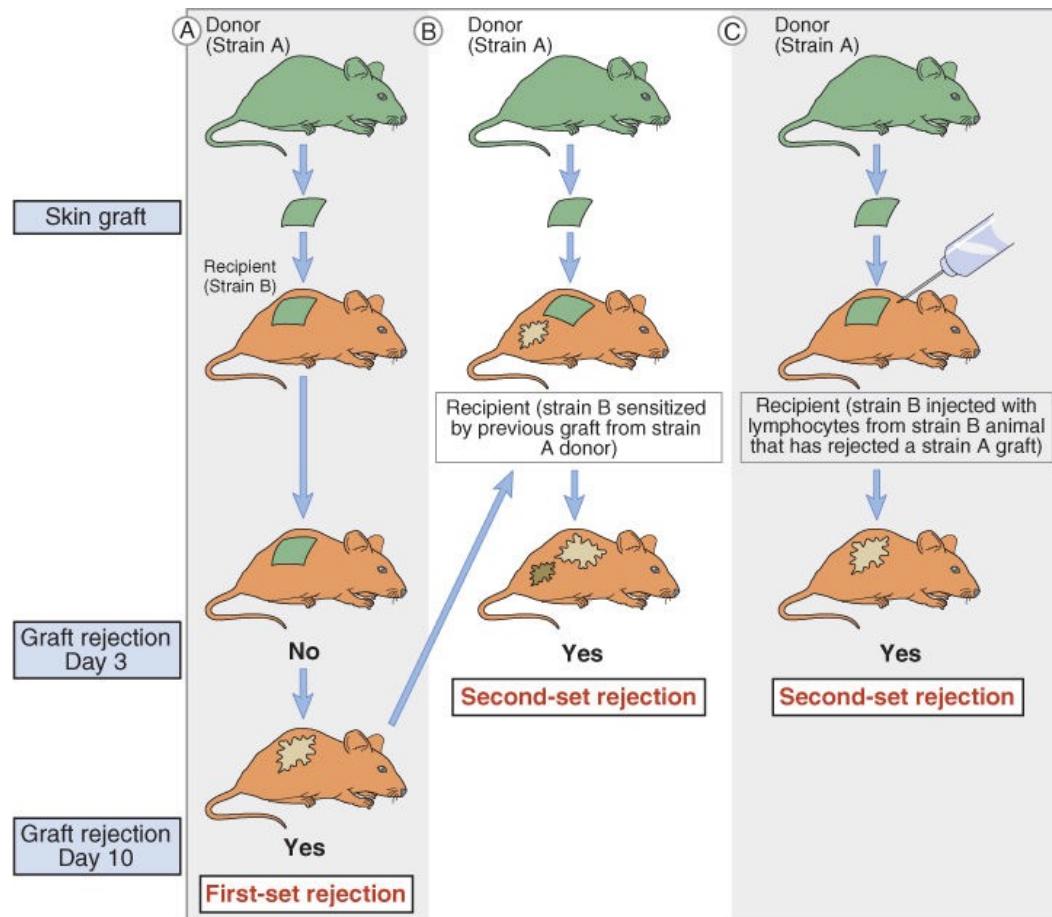
Il rigetto del trapianto rappresenta il principale ostacolo al successo dei trapianti. Questo problema si è presentato sin dai primi tentativi di sostituire la pelle di individui ustionati. Il primo a descrivere il fenomeno del rigetto del trapianto fu Earl C. Padgett nel 1932 che osservò che il trapianto di pelle da donatori casuali non sopravviveva. In un periodo di 1-2 settimane la pelle trapiantata andava incontro a necrosi con distacco e perdita dell'impianto cutaneo.

Queste osservazioni spinsero i ricercatori a studiare i trapianti cutanei in modelli animali.

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 autotripianto accettavano il tessuto, gli individui sottoposti ad allotripianto lo rigettavano (1943).

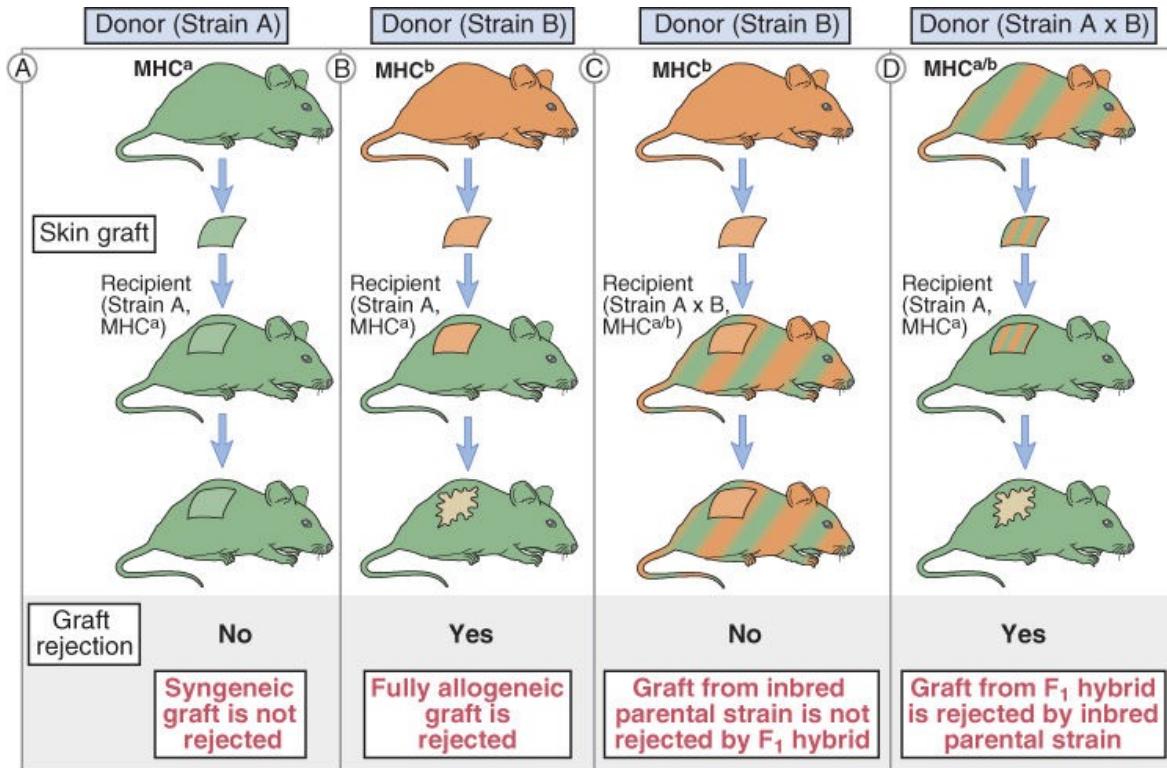
Espperimenti di trapianto di cute su topi di ceppo diverso dimostrano che il trapianto veniva rigettato in 7-10g. Rigetto primario

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.

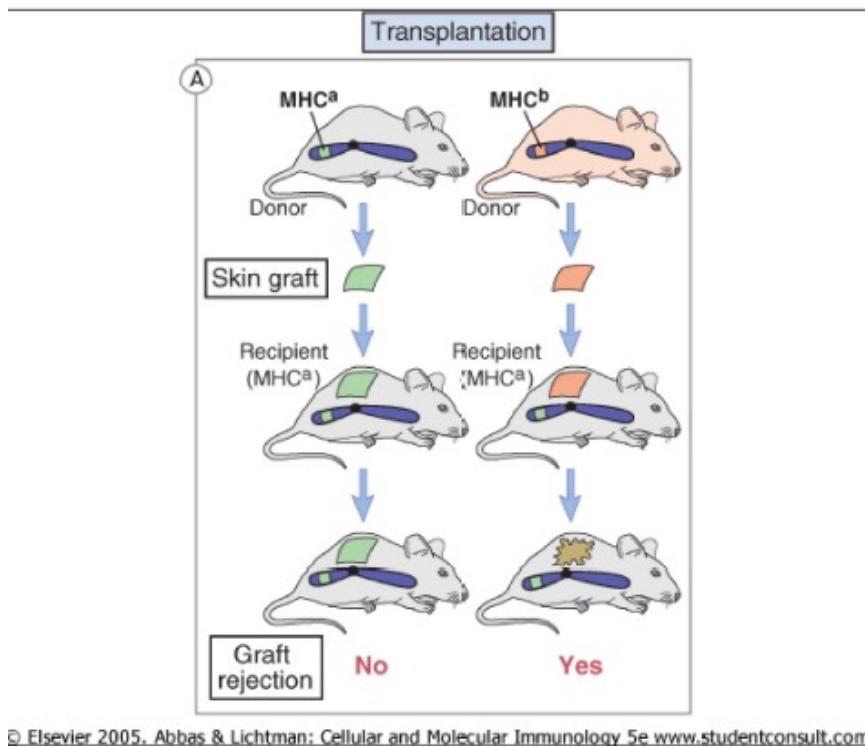


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

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

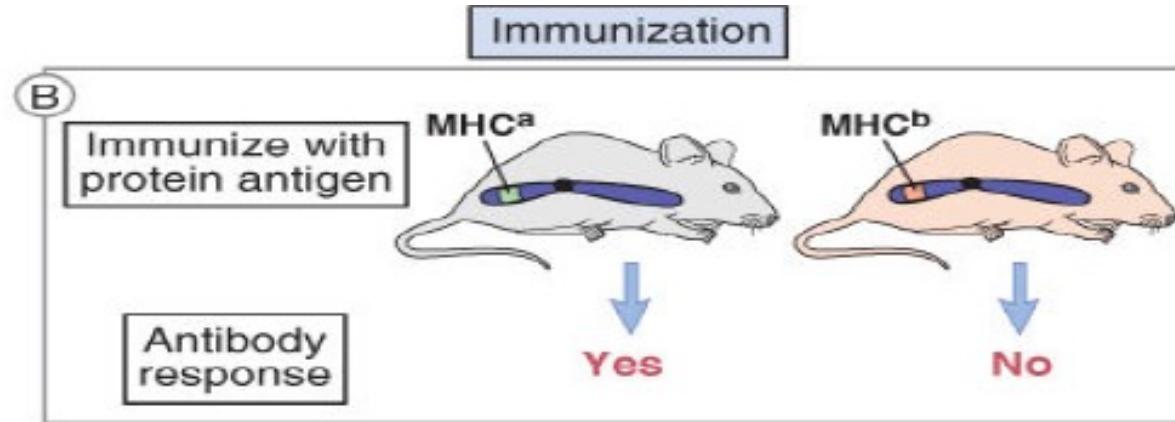
- Organi trapiantati fra due animali identici non sono rigettati.
- Organi trapiantati fra due animali geneticamente diversi sono rigettati.
- La prole derivante dall'incrocio di due animali di ceppo diverso non rigetta trapianti provenienti da i due genitori.
- Le molecole responsabili della reazione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

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



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).

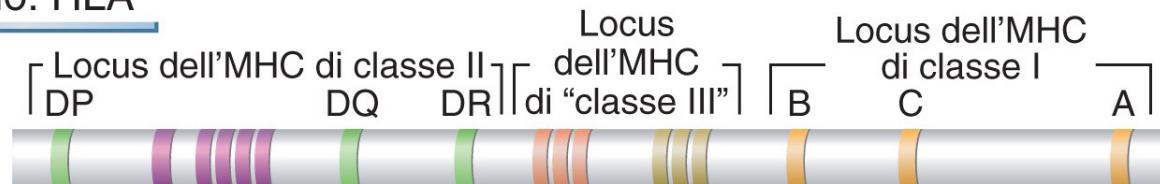
I geni del maggior Complesso di Istocompatibilità sono fondamentali in tutte le risposte immunitarie



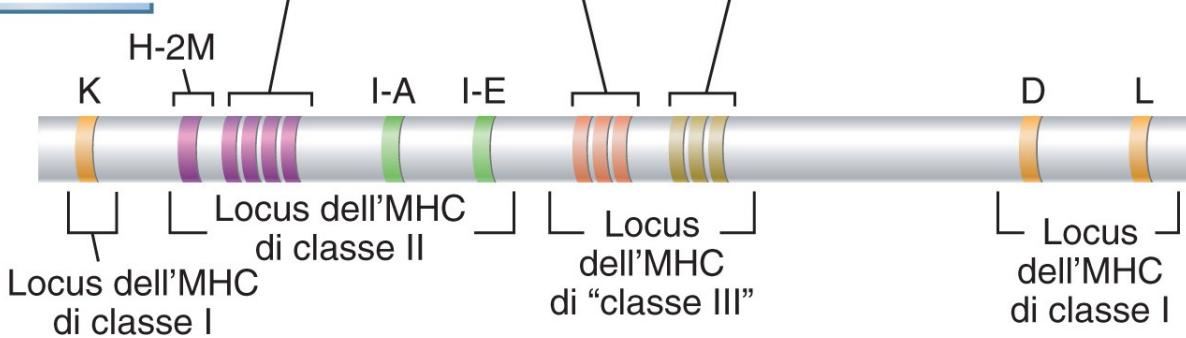
B. Benacerraf e H McDevitt studiando la risposta anticorpale di ceppi di topi congenici identifica i geni della risposta immunitaria e li mappa nell'MHC (anni '70).

Mappa dei loci dell'MHC

Uomo: HLA

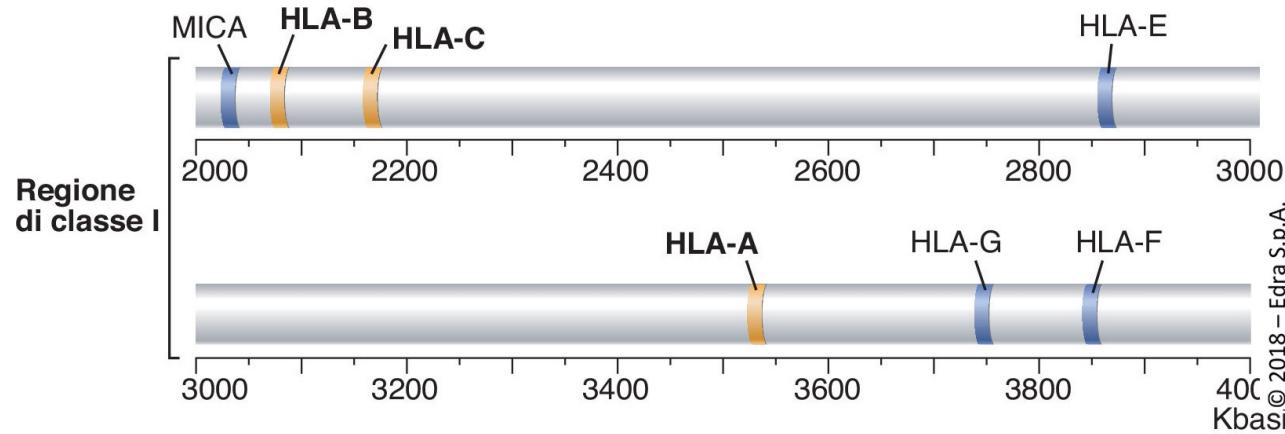


Topo: H-2



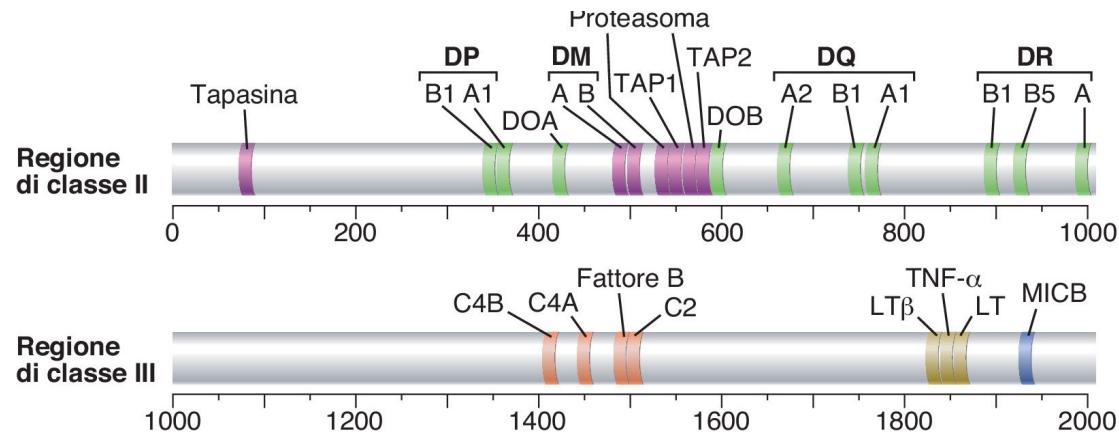
Il locus MHC presenta due tipi di geni polimorfi (classe I e classe II). Le molecole MHC di classe I e II sono strutturalmente distinte e entrambe sono coinvolte nella presentazione dell'antigene. Le molecole MHC di classe I e II presentano gli antigeni ai linfociti T CD8+ e CD4+ rispettivamente.

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 $\beta 2$ -microglobulina (gene localizzato sul crom.15). Le molecole HLA di classe I sono esprese costitutivamente su quasi tutte le cellule nucleate.

Molecole MHC di classe II

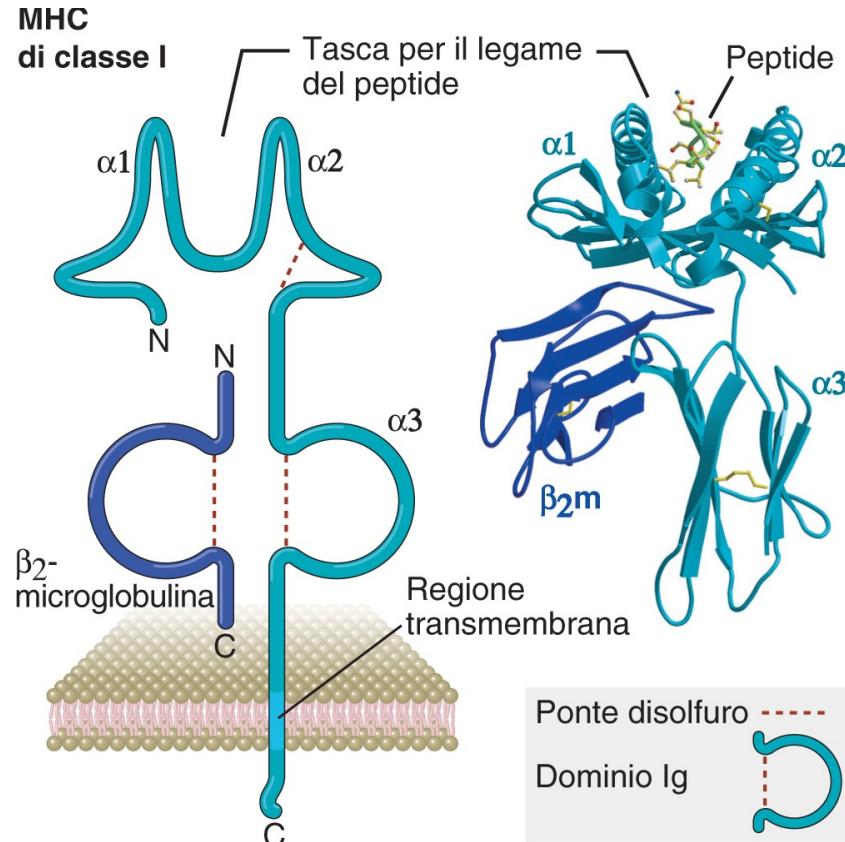


All'interno del locus dell'MHC di classe II sono presenti i geni codificanti le catene α e β che costituiscono le molecole HLA di classe II. Tali molecole sono il DP, DQ e il DR.

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



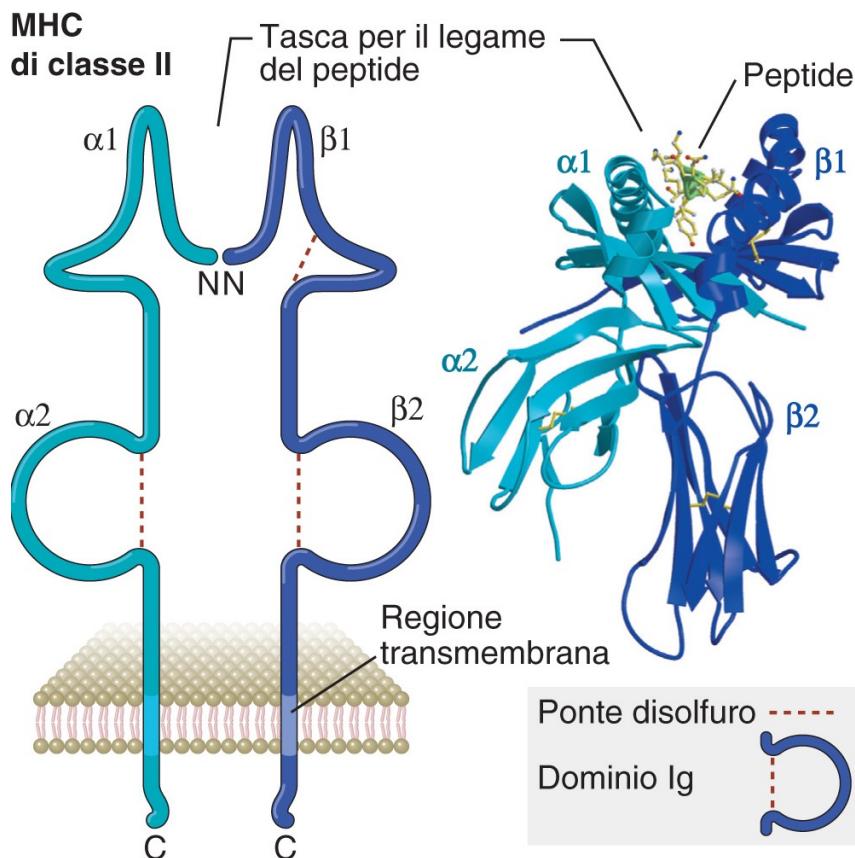
Le molecole MHC di classe I sono costituite da due catene polipeptidiche non legate covalentemente: la catena α e la β_2 -microglobulina. Nella catena α i domini α_1 e α_2 formano la tasca di legame con il peptide costituita da un pavimento a foglietto β di otto filamenti antiparalleli e due pareti ad α -elica. La tasca è capace di legare peptidi di 9-11aa.

Il dominio α_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 α_1 e β_1 delle catene delle molecole di classe II interagiscono fra loro per formare la tasca di legame con il peptide.

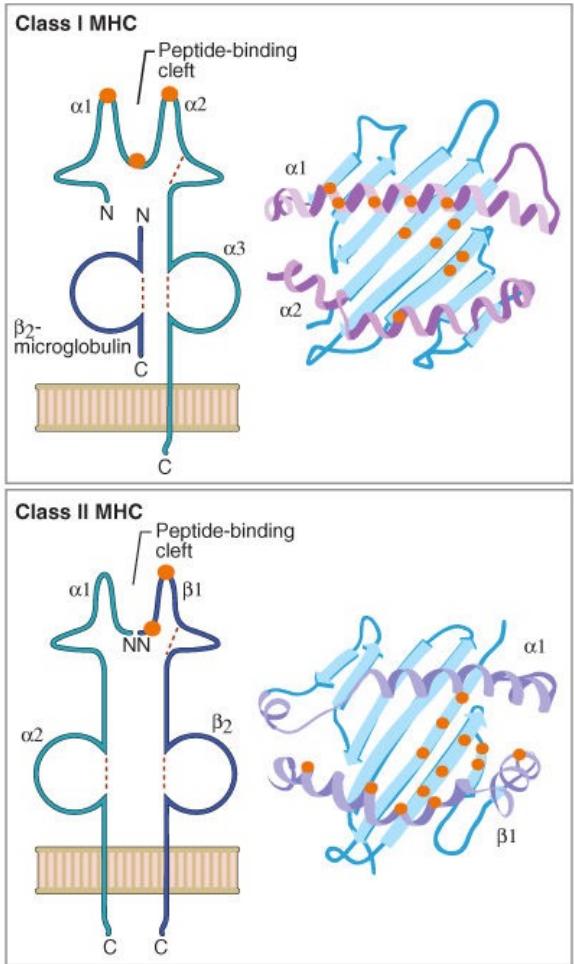
4 nastri che compongono il pavimento e 1 α -elica sono formati da α_1 , gli altri 4 nastri del pavimento e l'altra α -elica sono formati da β_1 .

I residui polimorfi sono localizzati nelle regioni α_1 e β_1 e nell'uomo il polimorfismo maggiore si ha nella catena β .

I segmenti α_2 e β_2 non sono polimorfi. Un segmento della regione β_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

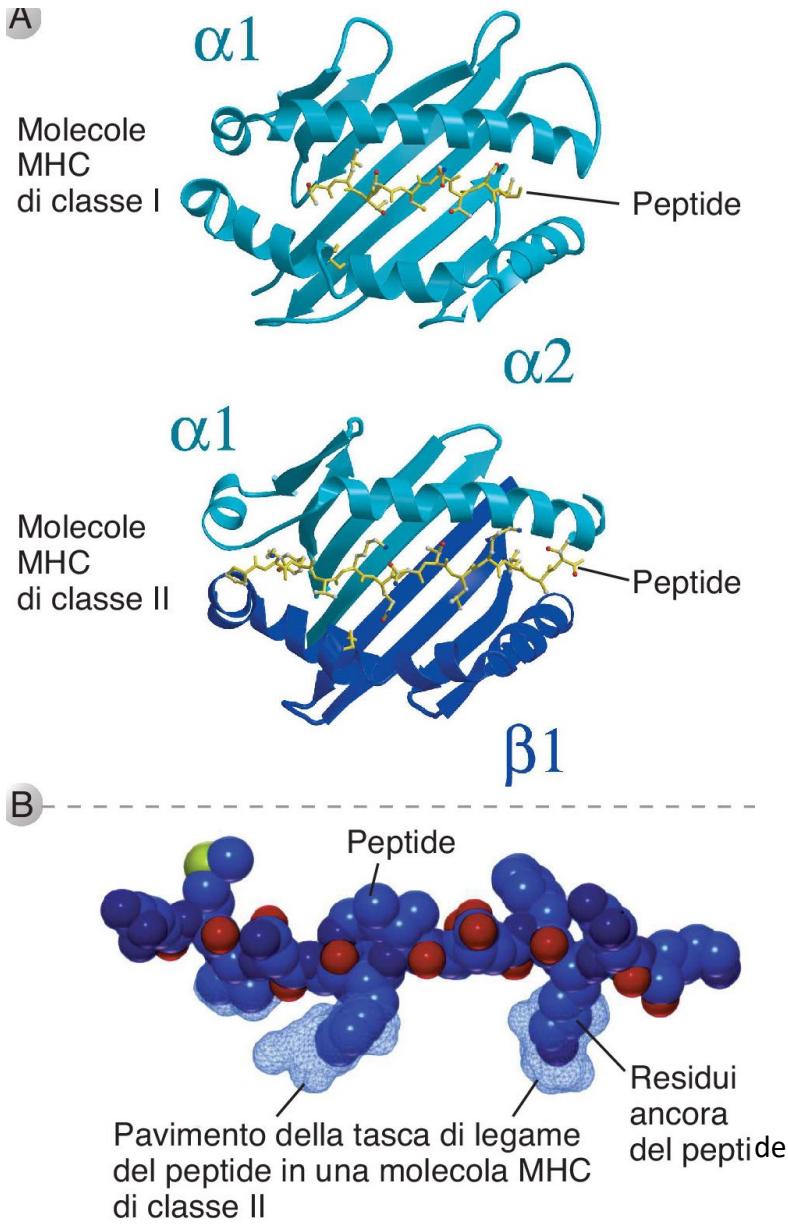
Molecole MHC di classe I e II



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

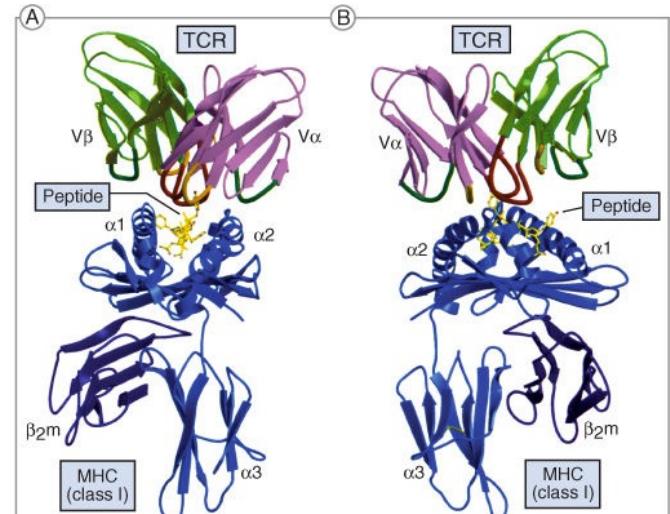
- Ogni molecola MHC contiene una vera e propria tasca a cui si legano i peptidi da presentare ai linfociti T.
- I residui aminoacidici polimorfi delle molecole MHC sono situati all'interno e nelle vicinanze della tasca di legame per il peptide
- Le regioni non polimorfiche contengono siti di legame per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

Basi strutturali del legame dei peptidi alle molecole MHC

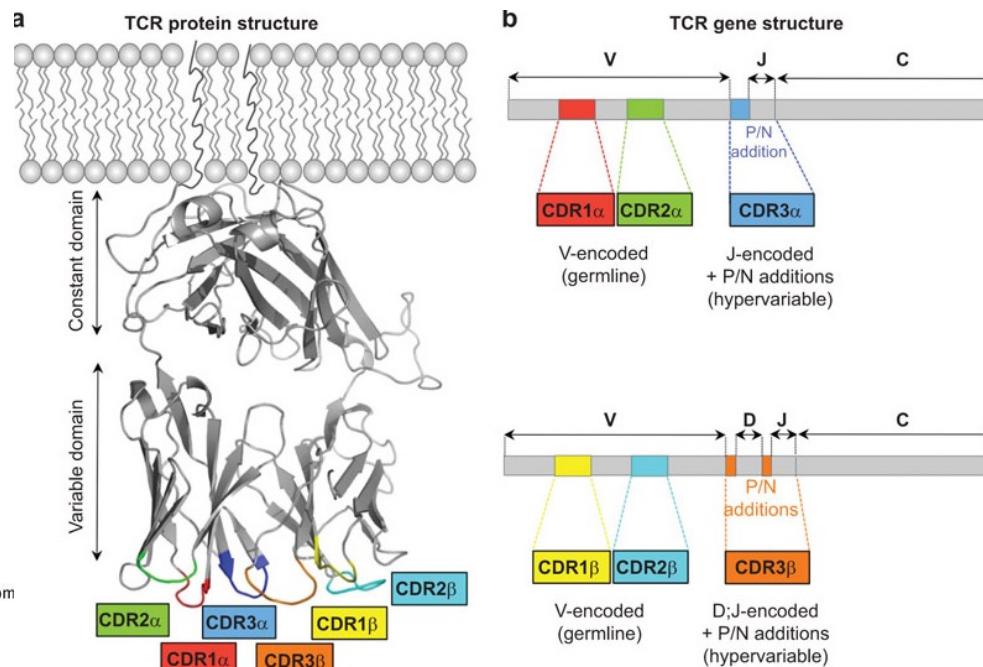
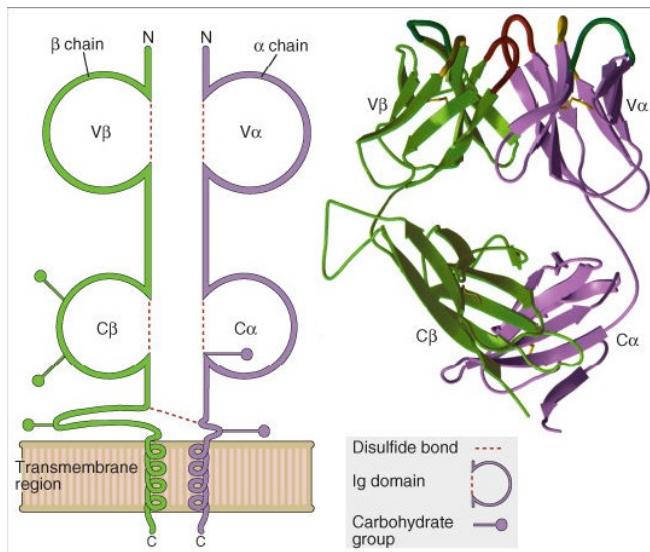


- Il legame dei peptidi alle molecole MHC è una interazione non covalente tra residui presenti nel peptide e nella tasca MHC.
- Il foglietto β del pavimento della tasca forma nicchie a cui si adattano le catene laterali dei residui aminoacidici del peptide. Per esempio molte molecole MHC di classe I 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 legano 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

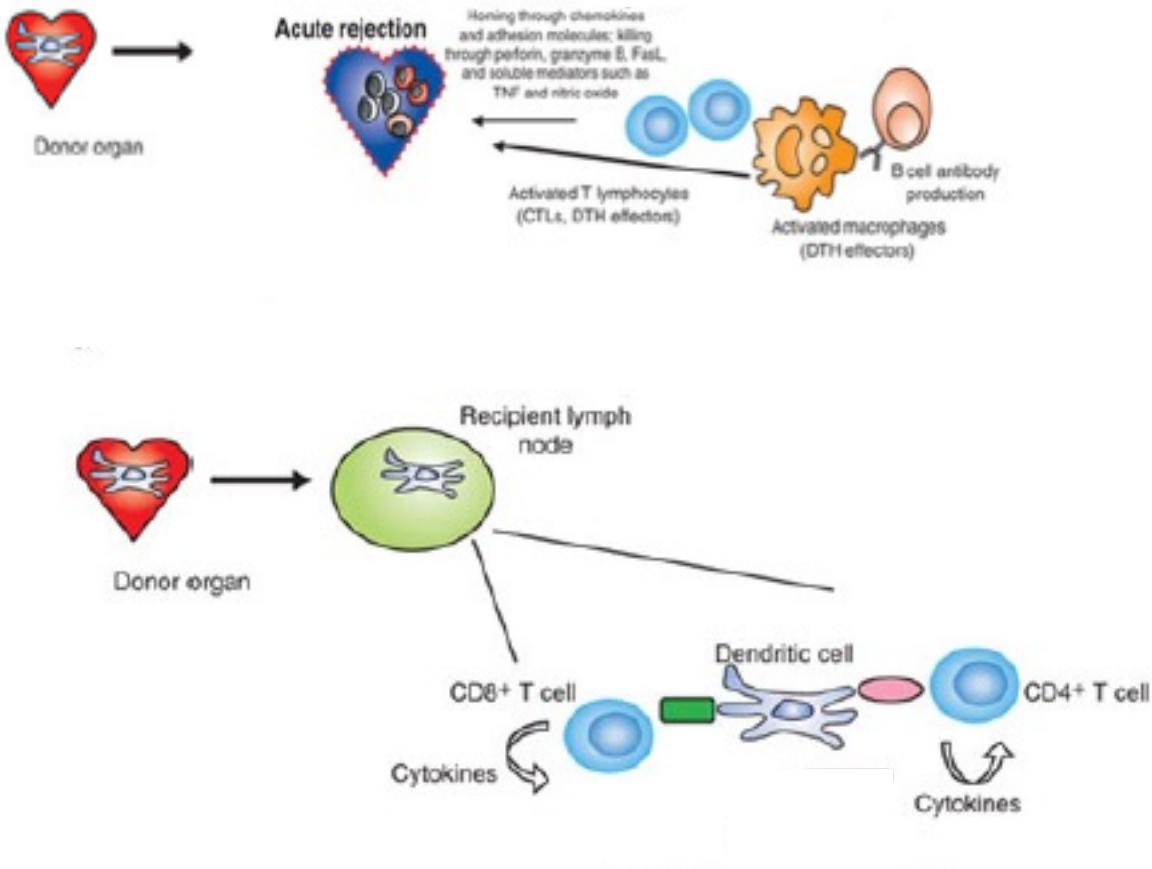


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



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 regione V 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 del ricevente sono in grado di riconoscere i complessi costituiti dalle molecole MHC+peptidi del donatore. Questi linfociti T sono definiti alloreattivi e mediano il danno vascolare e parenchimale dell'organo trapiantato. I linfociti T possono riconoscere le molecole MHC allogeniche 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

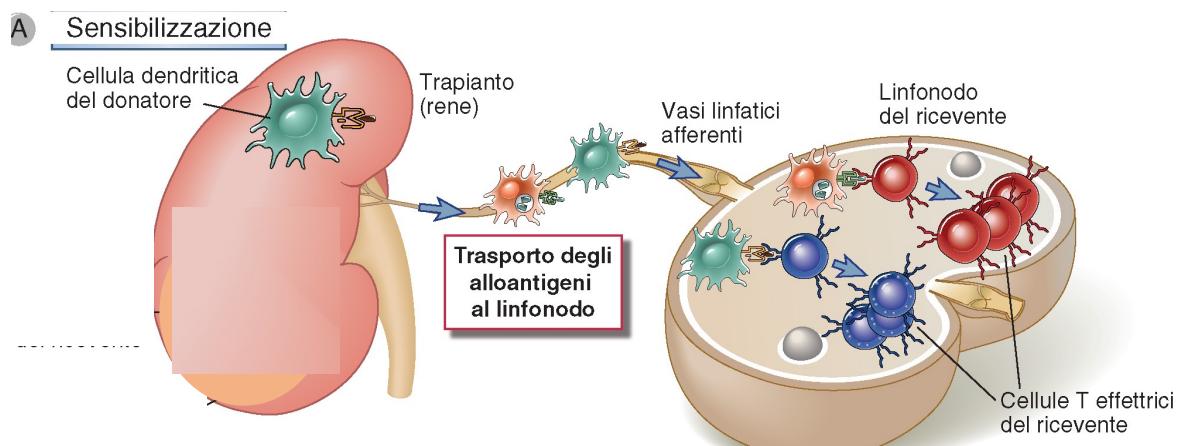
Diversi studi hanno dimostrato che la maggior parte dei linfociti T alloreattivi riconoscono le molecole MHC allogeniche associate ai peptidi del donatore. I meccanismi attraverso i quali questi complessi sono presentati alle cellule T del recipiente sono stati al centro di numerosi studi. Più di 30 anni fa è stato proposto che le

- le DC del donatore sono le principali antigen presenting cells (APC) responsabili dell'attivazione dei linfociti T allogenici. Le DC del donatore presentano i complessi MHC del donatore intatti + il peptide.

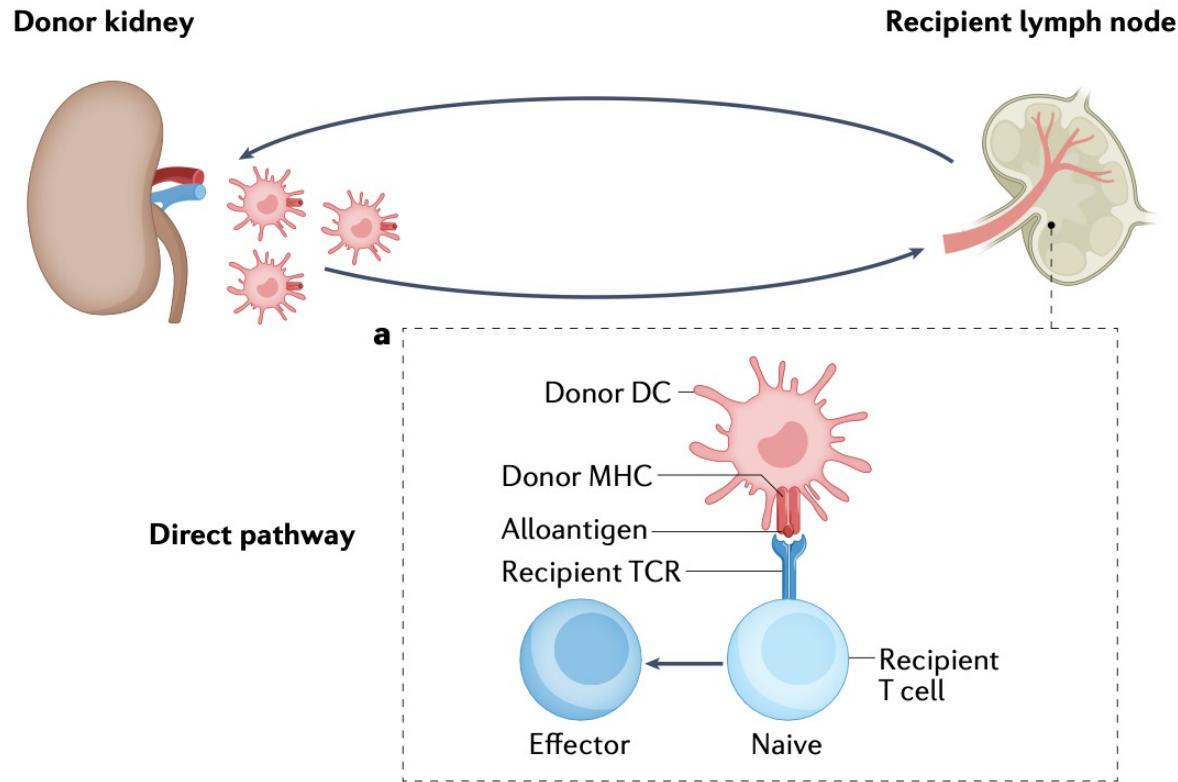
Questa teoria è stata sostenuta dalle evidenze che:

- 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.



Via diretta di presentazione degli alloantigeni



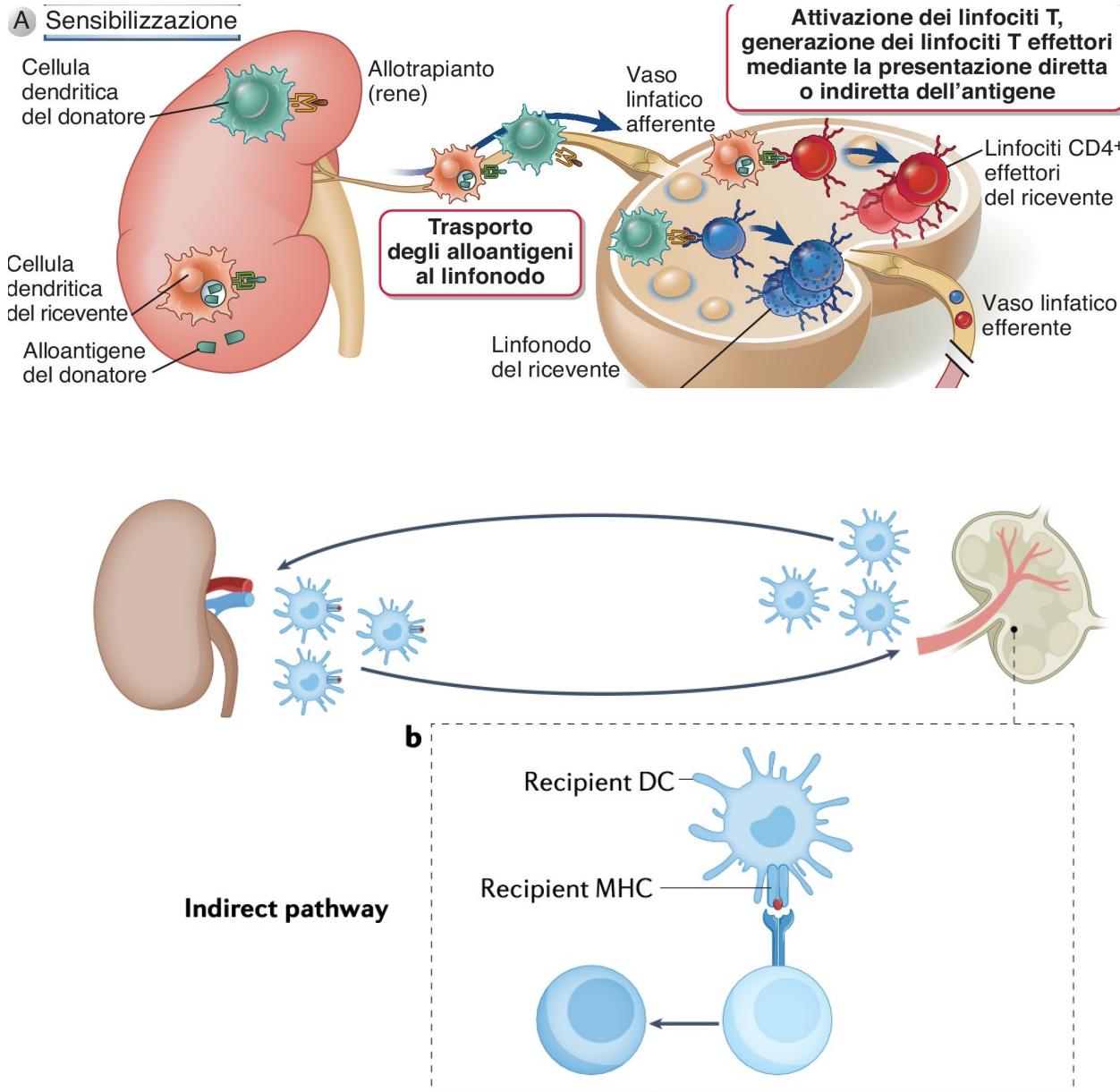
Nel pathway diretto di presentazione degli alloantigeni le DC del donatore migrano dall'organo trapiantato al linfonodo dove attivano i linfociti T alloreattivi.

Il rigetto del trapianto non avviene negli animali che mancano di organi linfoidi secondari

La sensibilizzazione agli alloantigeni presentati dalle cellule dendritiche avviene nei linfonodi.

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

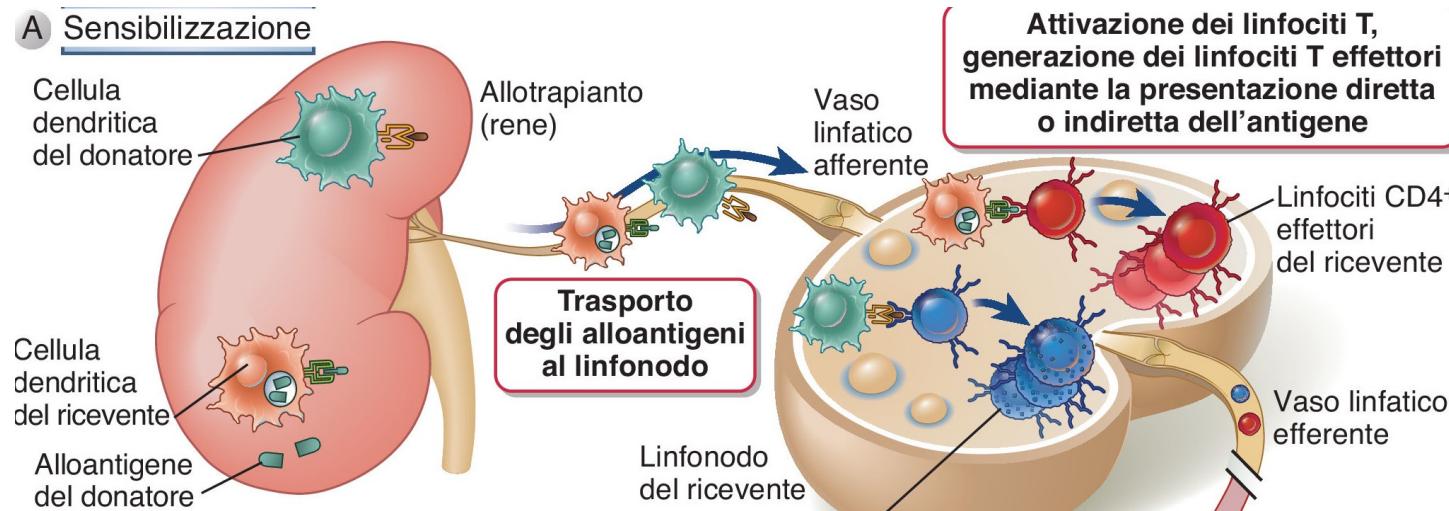
Via indiretta di presentazione degli allo-antigeni



Studi successivi hanno dimostrato che i trapianti nel tempo perdono le DC del donatore e l'organo trapiantato è ripopolato dalle DC del ricevente. E' stato quindi proposto che gli allo-antigeni potessero essere riconosciuti nel modo convenzionale e cioè essere processati e presentati in associazione con le molecole MHC del ricevente.

Nella via indiretta di presentazione degli allo-antigeni, le DC del ricevente migrano nel trapianto, catturano gli antigeni del donatore e li presentano nei linfonodi ai linfociti T.

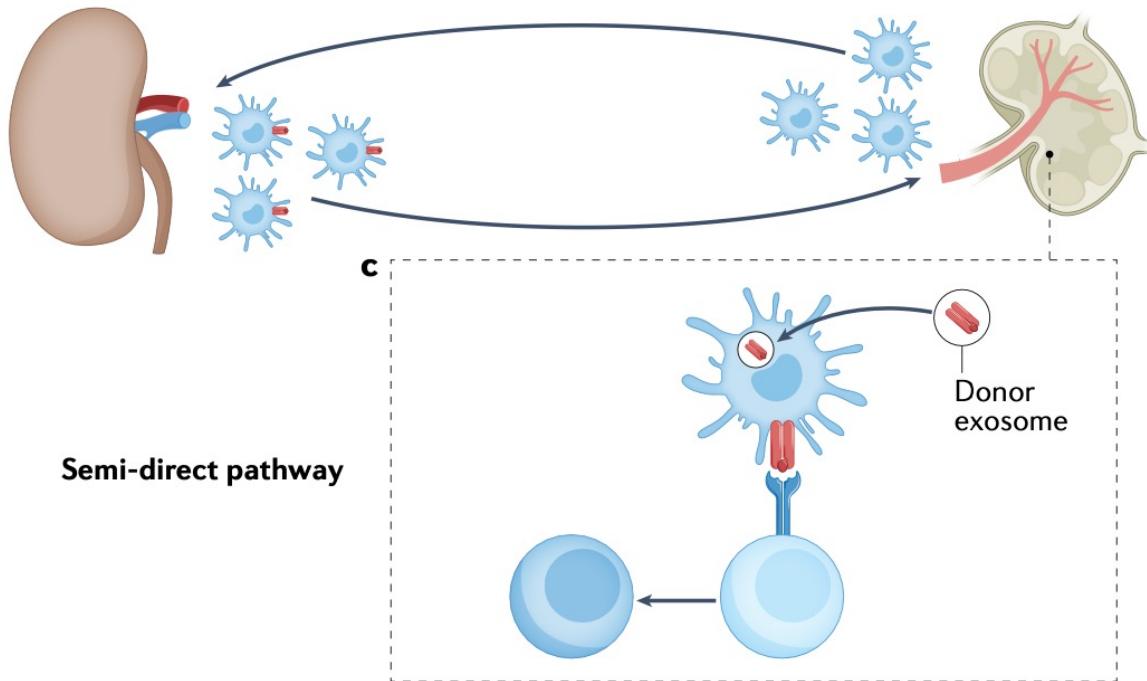
L'induzione (priming) delle risposte alloreattive avviene nei linfonodi da parte delle cellule dendritiche del donatore o del ricevente



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

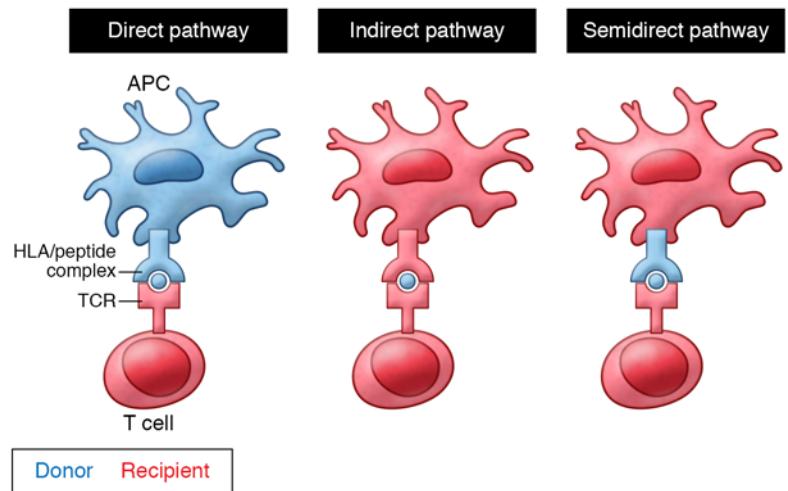
Per esempio nei trapianti di rene del ratto era stato osservato che la deplezione delle cellule dendritiche del donatore non impediva il rigetto del trapianto anche se questo si manifestava più lentamente. **Indirect pathway of alloantigen presentation**

Via semi-diretta di presentazione degli allo-antigeni



Ulteriori studi hanno dimostrato che le molecole MHC allogeniche + peptide (del donatore) possono essere trasferite alle cellule dendritiche del ricevente dalle DC 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**.

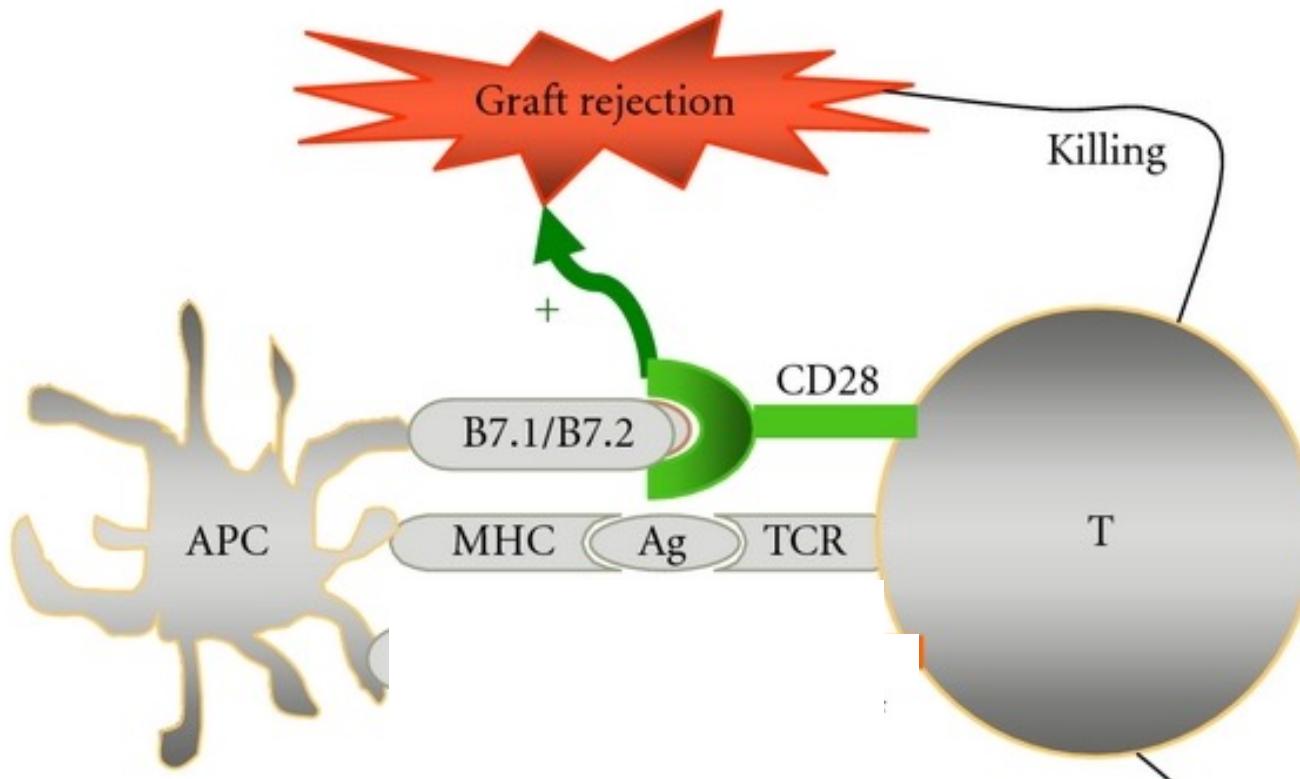
Diversi modi di alloriconoscimento



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.

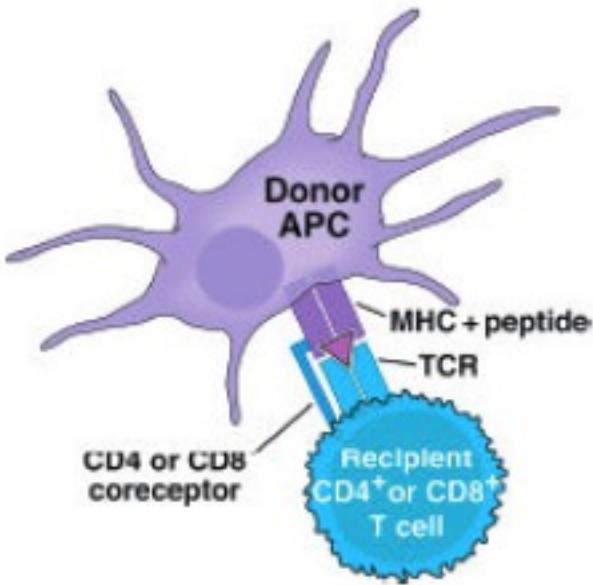
Il riconoscimento degli alloantigeni da parte del TCR e la costimolazione da parte del CD28 sono necessari per l'attivazione dei linfociti T alloreattivi



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

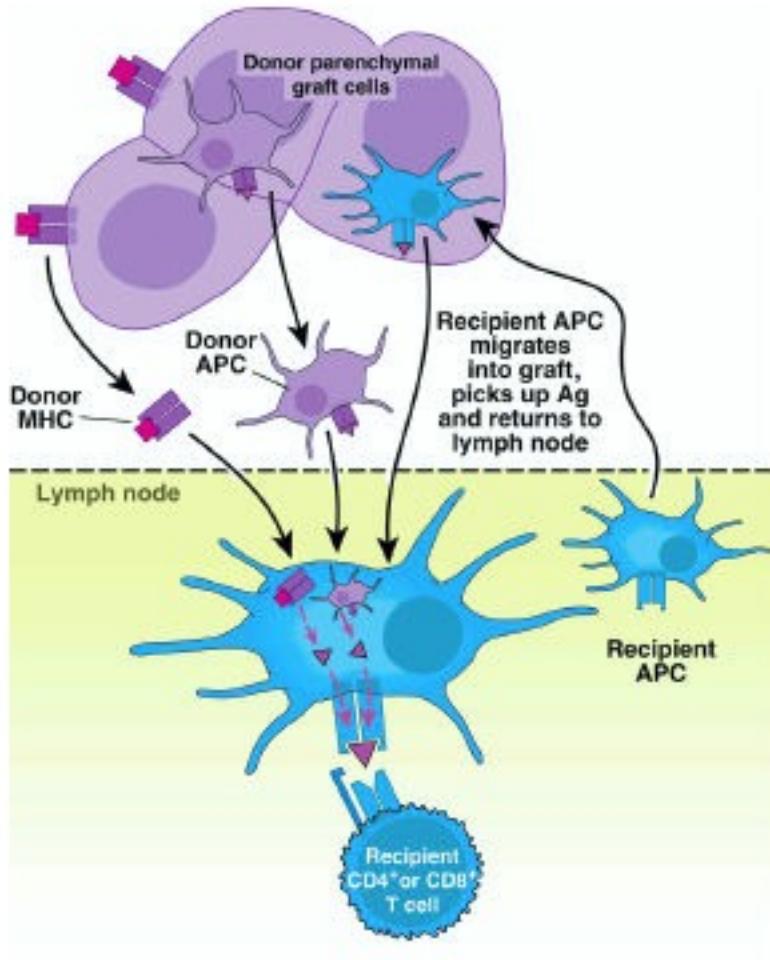
Presentazione diretta delle molecole MHC allogeniche

(A)



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

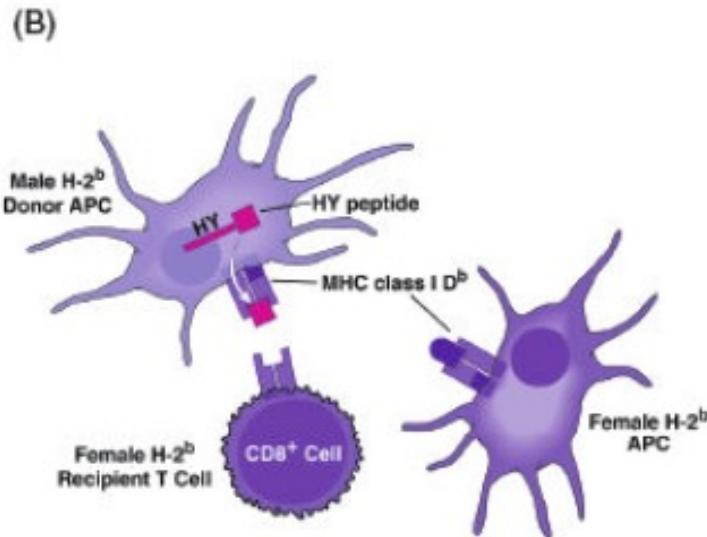
Meccanismi potenziali della processazione indiretta



La presentazione degli antigeni del donatore da parte delle APC del ricevente può avvenire:

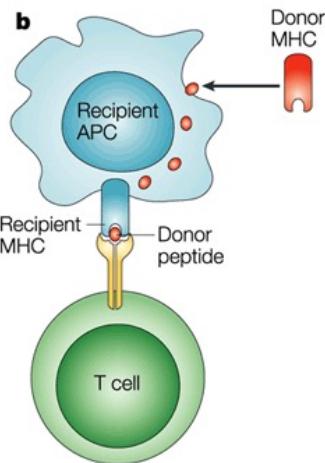
- Le APC del ricevente migrano nel trapianto, captano gli antigeni del donatore e ritornano negli organi linfoidi secondari.
- Le APC del donatore possono migrare negli organi linfoidi secondari del ricevente ed essere endocitate.
- Le molecole MHC libere del donatore possono essere processate dalle APC del ricevente.

Antigeni minori di istocompatibilità



Oltre al riconoscimento 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

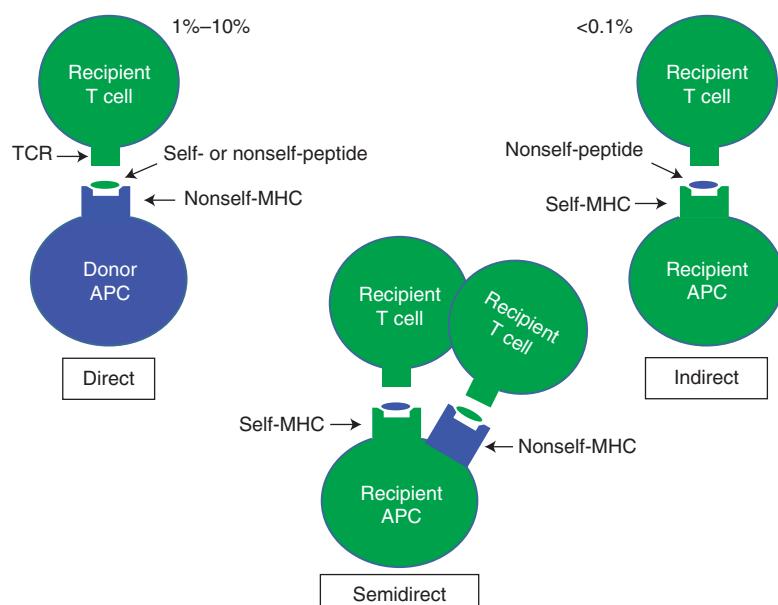


Figure 1. Pathways of alloantigen presentation. The three pathways of alloantigen presentation (direct, indirect, and semidirect) are shown. The frequency (%) of T cells that react to a specific pathway is indicated where known. APC, antigen-presenting cell; MHC, major histocompatibility complex molecule;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

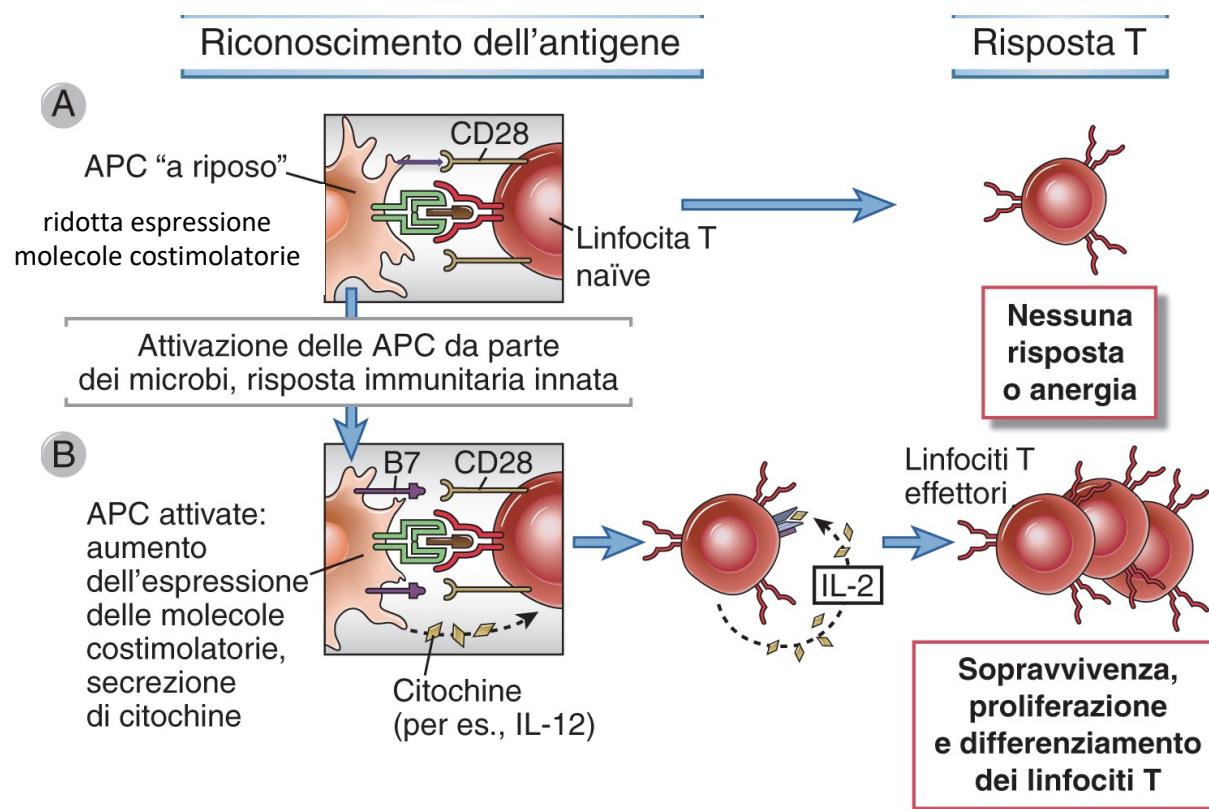
Molti degli antigeni presentati per via indiretta includono:

- 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.

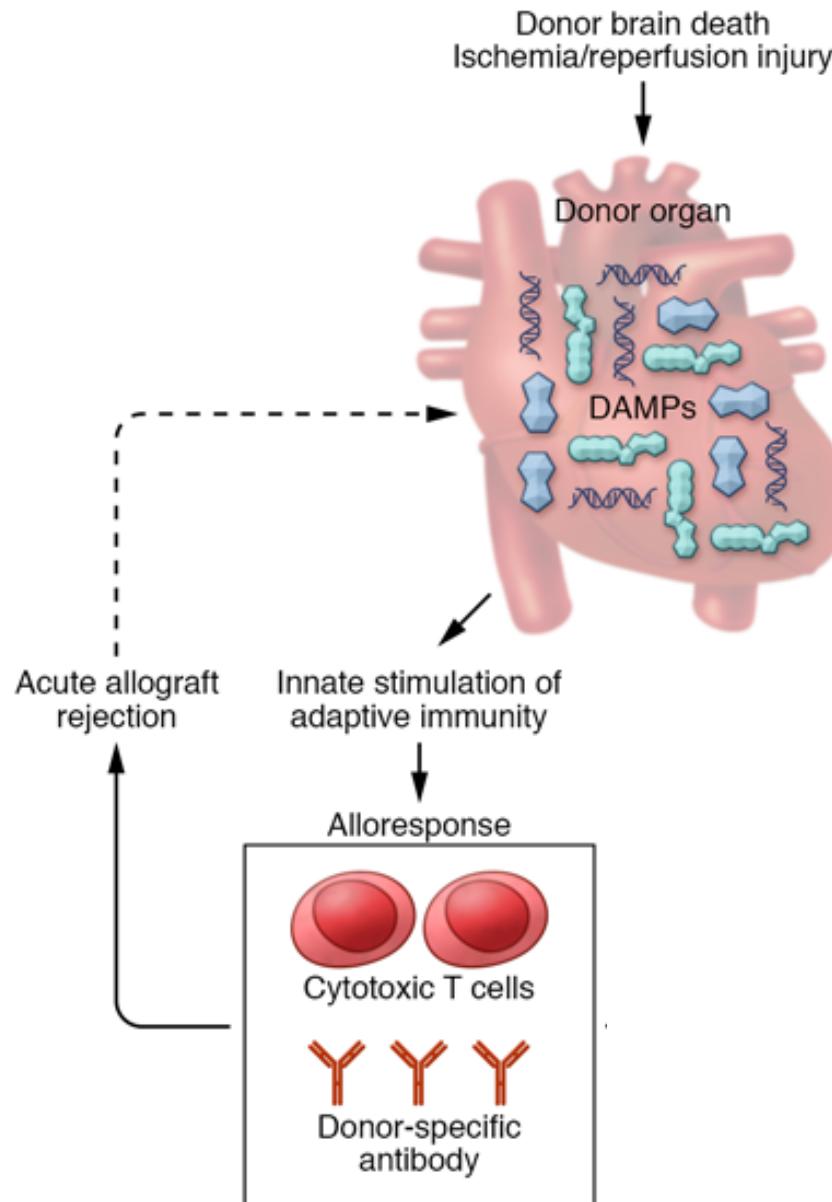
• I linfociti T CD4+ attivati per via diretta ed indiretta differenziano in linfociti Th1 producenti IFN- γ .

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

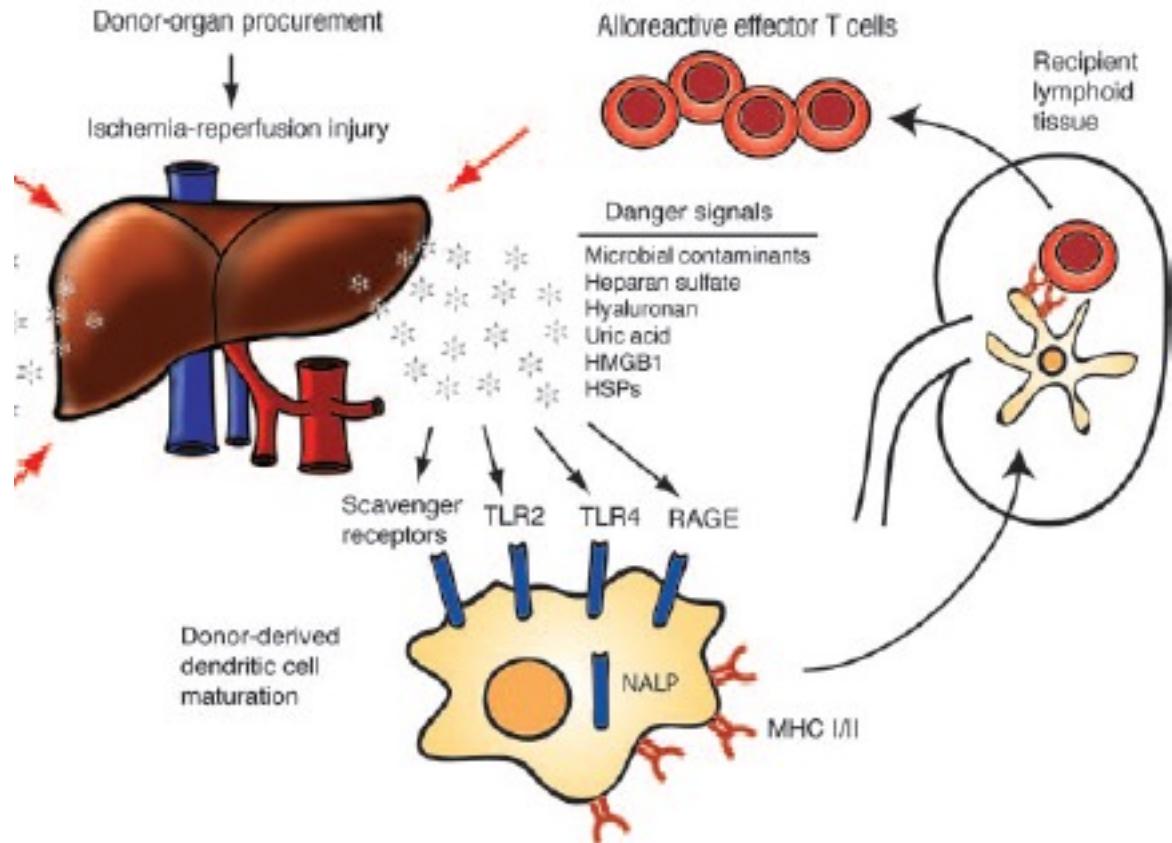
- Sterile inflammation occurs in organs after their surgical removal and implantation into a recipient
- Inflammation that occurs after solid organ transplantation can precipitate acute allograft rejection, impede transplant tolerance and enhance the development of chronic allograft rejection
- Experimental 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 favorisce lo sviluppo del rigetto acuto e cronico.

L'infiammazione sterile nel trapianto di organo solido deriva dal danno conseguente a ischemia- riperfusione (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'espianto 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/riperfusione portano al rilascio di componenti cellulari in grado di stimolare le cellule dell'immunità innata 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

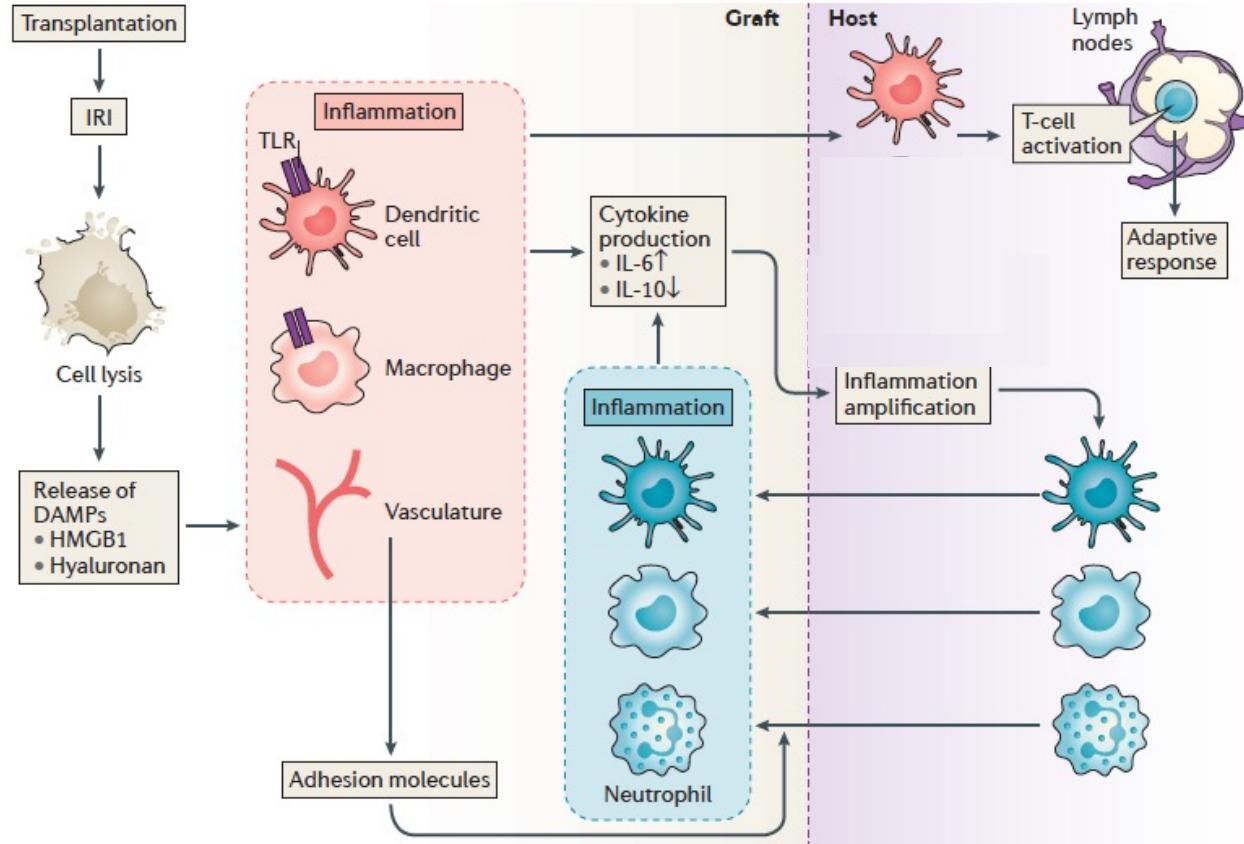
DAMP	Putative receptor(s)	Solid organ(s)
HMGB1	TLR4, RAGE	Heart, lung, kidney, liver
ATP	P1, P2X, P2Y	Heart, liver
Heat shock proteins	TLR2/4, CD40, CD91, LOX-1	Heart, lung, kidney, liver
Nucleic acids/mitochondrial contents	TLR9, NALP3	Heart, lung, kidney, liver

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.

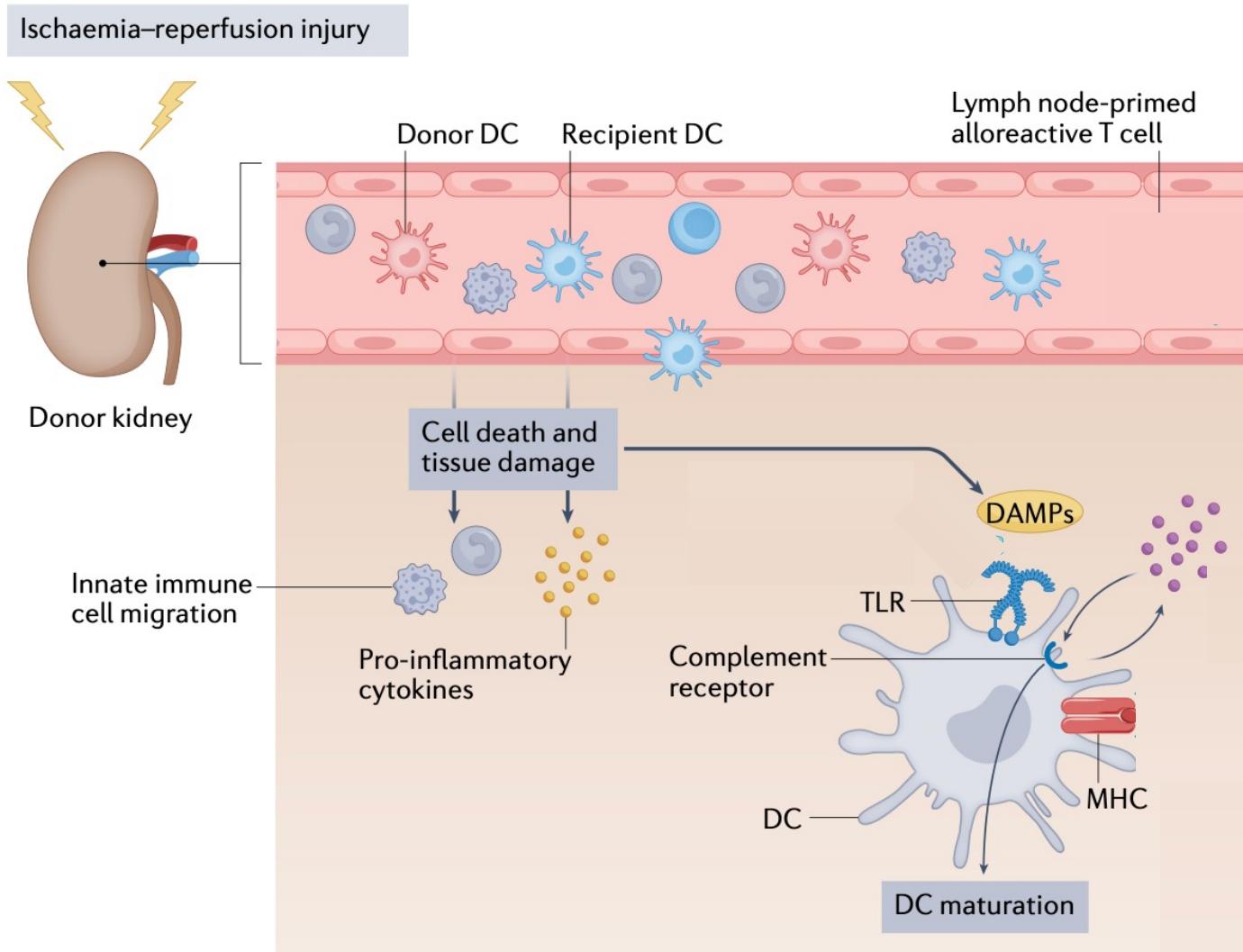
Il trattamento con antagonisti del recettore P2X7 promuove il trapianto di cuore in un modello murino mismatched per le molecole MHC.

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



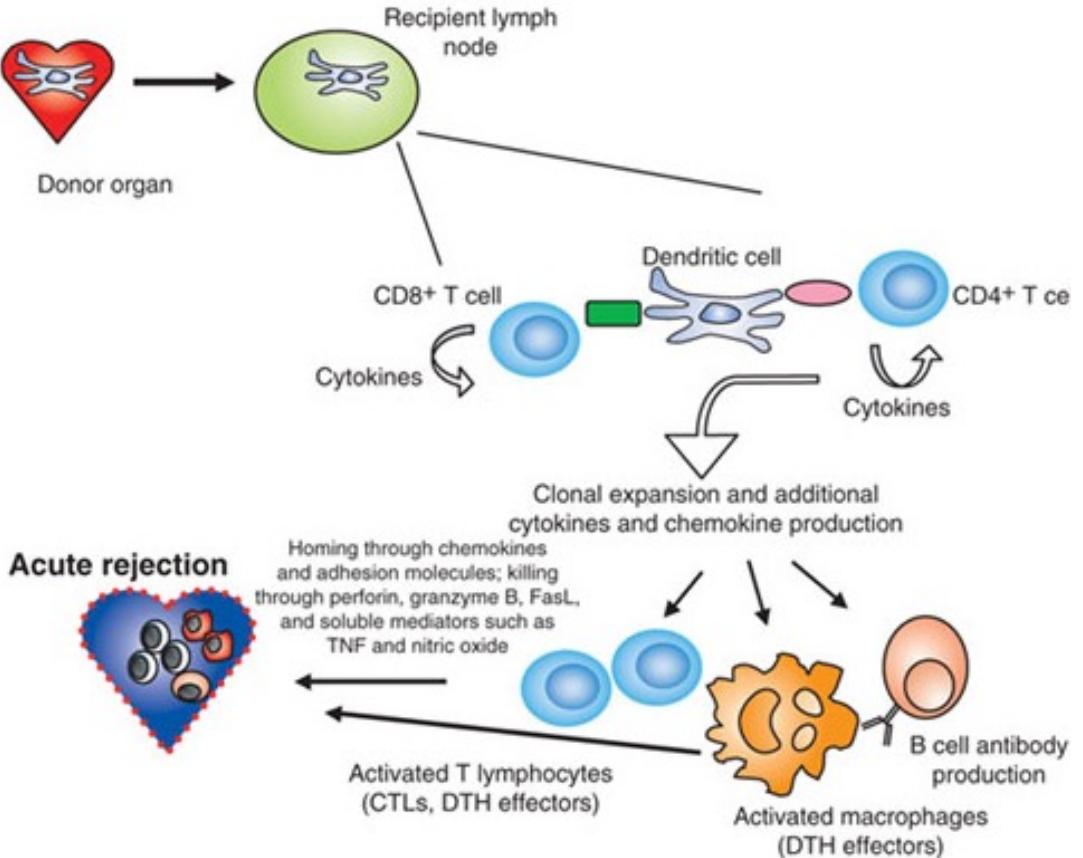
Il rilascio di "damage associated molecular patterns" (DAMPs) in seguito a IRI attivano le cellule dell'immunità innata (macrofagi e cellule dendritiche) attraverso la stimolazione dei Toll like receptor. In seguito alla stimolazione dei Toll like receptors le DC e i macrofagi producono citochine pro-infiammatorie (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 stimolati dai DAMPs contribuiranno al processo infiammatorio. La stimolazione del TLR sulle DC ne induce la maturazione favorendo l'attivazione dei linfociti T alloreattivi promuovendo il rigetto del trapianto.

Maturazione delle cellule dendritiche durante l'ischemia reperfusion injury (IRI)



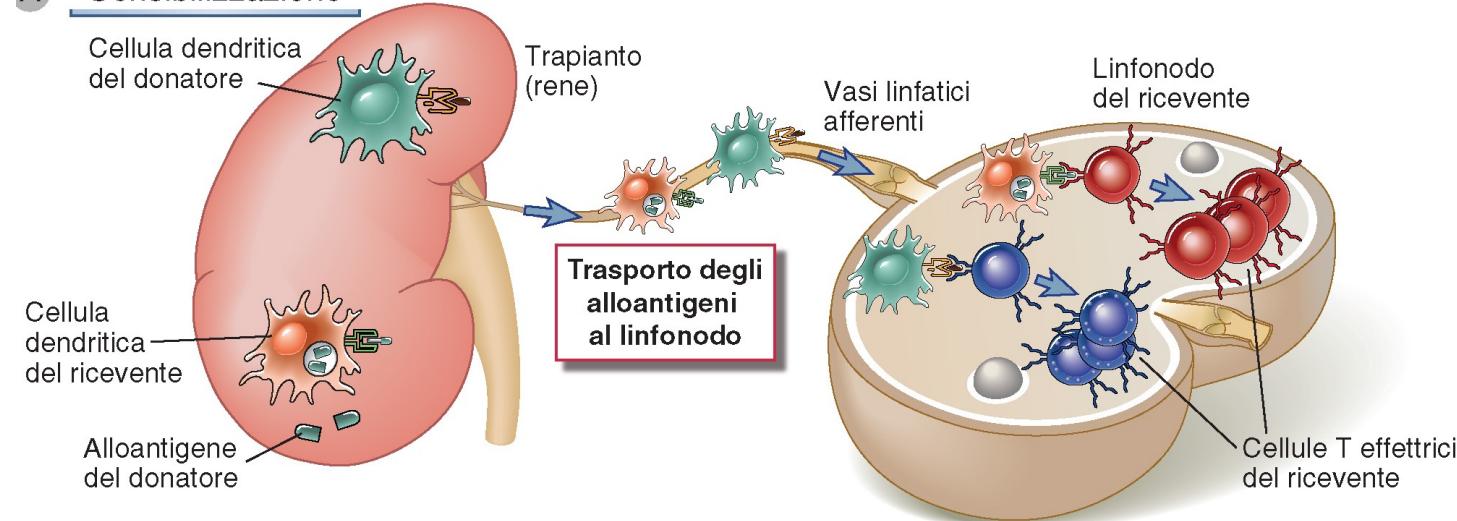
Il processo infiammatorio causato dal rilascio di molecole associate al danno dovuto a ischemia riparazione precede l'attivazione delle risposte T alloreattive. L'infiammazione sterile richiama neutrofili e monociti che stimolati dai DAMs attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie sostengono il processo infiammatorio. I DAMs stimolano anche le DC e ne inducono la maturazione con conseguente migrazione nei linfonodi dove attiveranno i linfociti T alloreattivi.

Il rigetto del trapianto

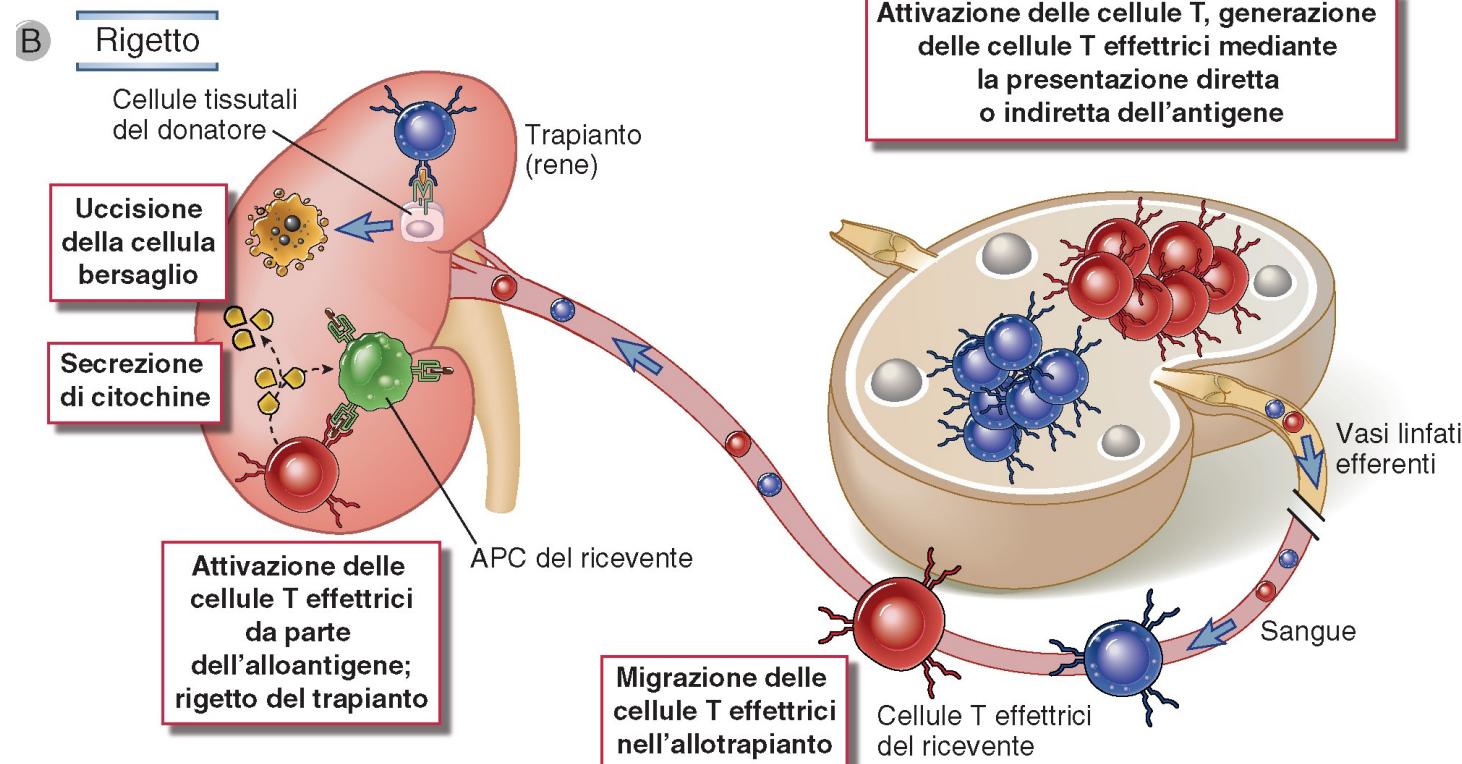


In seguito all'attivazione e al differenziamento dei linfociti T alloreattivi nei linfonodi mediante presentazione diretta o indiretta degli alloantigeni da parte delle cellule dendritiche, i linfociti T migrano nell'organo trapiantato dove svolgono le loro azioni effettive.

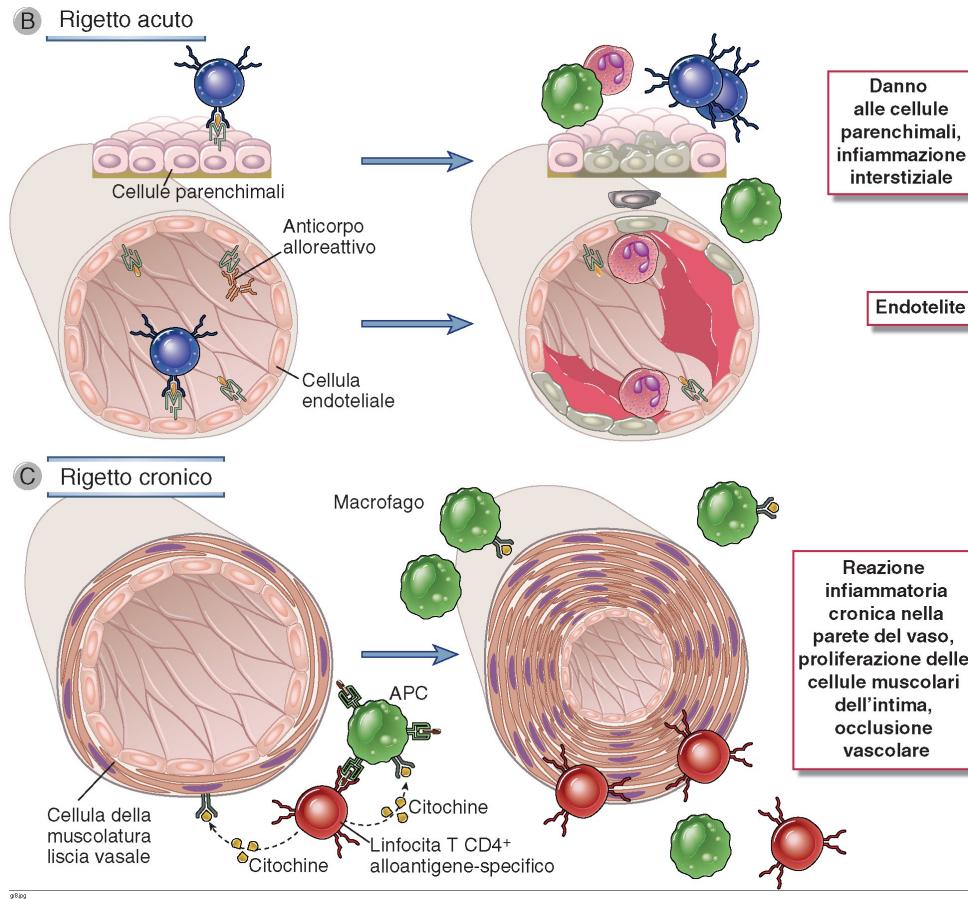
A Sensibilizzazione



B Rigetto



Meccanismi del rigetto del trapianto mediato dai linfociti T



Il rigetto del trapianto mediato dai linfociti T viene classificato in base alle caratteristiche istopatologiche o all'intervallo di tempo che intercorre fra il trapianto e il rigetto.

Il rigetto acuto si manifesta generalmente non prima di una settimana dal trapianto ed è la manifestazione di un processo di danno vascolare e parenchimale. Questo rigetto è caratterizzato da infiltrazione leucocitaria del trapianto.

Il rigetto cronico è caratterizzato dall'occlusione delle arterie come conseguenza della proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali. Questo rigetto si manifesta nei 6-12 mesi successivi al trapianto.