

Come agiscono le cellule «killer»

Riconosciuta una cellula bersaglio, queste componenti del sistema immunitario aderiscono a essa e secernono una proteina letale che ne perfora la membrana provocando così la fuoriuscita del citoplasma

di John Ding-E Young e Zanvil A. Cohn

Il sistema immunitario viene di solito paragonato a un esercito e i vari tipi di cellule che lo compongono a soldati. L'analogia è particolarmente azzeccata nel caso delle cosiddette cellule *killer*, il cui compito primario consiste nel dare la caccia alle cellule dell'organismo che funzionano male e nel distruggerle: in questo modo esse uccidono le cellule tumorali e quelle infettate da virus (e forse anche da altri agenti estranei). Da alcuni anni ci si è resi conto che le cellule killer svolgono il loro compito con notevole efficienza: dapprima scovano la cellula degenerare poi la bloccano e, alla fine, fanno «qualcosa» che ne provoca la morte, riuscendo nel contempo a salvaguardare le cellule sane adiacenti. Ma come agiscono esattamente?

Oggi sappiamo che, scelto un bersaglio e legatasi a esso, la cellula killer si rivolge contro la superficie della vittima e la perfora. Più precisamente, vi «spara contro» molecole di una proteina letale che trapassano la membrana del bersaglio e formano fori, o meglio canalicoli, attraverso cui il contenuto della cellula fuoriesce così che essa muore.

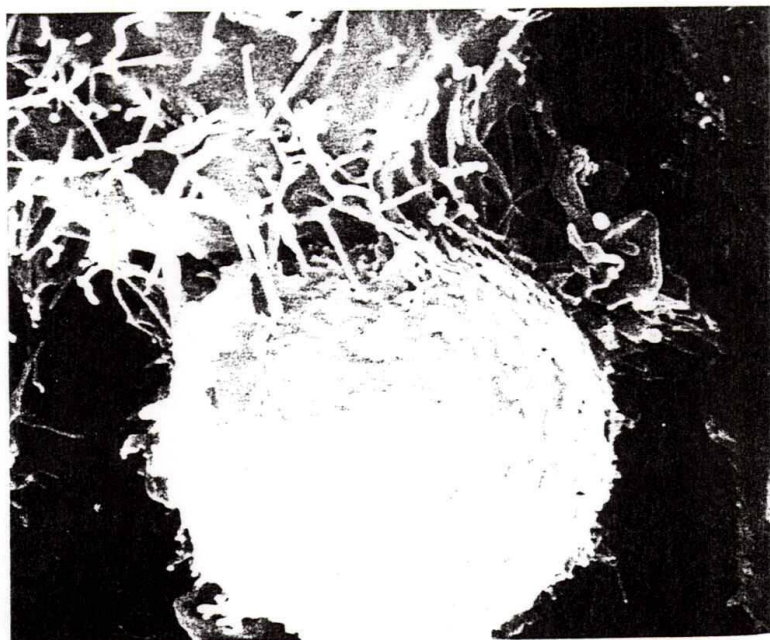
Ricerche compiute in numerosi laboratori, tra cui il nostro presso la Rockefeller University, hanno dimostrato che le proteine perforanti fanno parte dell'armamentario di entrambi i tipi di cellule killer: i linfociti *T* citotossici e le cellule *natural killer* (NK), appartenenti alla popolazione dei grandi linfociti granulari (LGL). Una proteina con analoga funzione è stata da noi trovata anche in un altro tipo di cellule del sistema immunitario, le cellule eosinofile. Inoltre, risulta che la stessa proteina, o una molto simile, sia responsabile degli attacchi che un'ameba sferra contro cellule umane con la conseguente comparsa di una grave forma di dissenteria.

Si comincia a pensare che le proteine perforanti siano un'arma importante in

molti casi di distruzione cellulare mediata da cellule. Una maggior conoscenza del processo dovrebbe avere notevoli ripercussioni in medicina. Per esempio, potrebbe rivelarsi vantaggioso trattare la dissenteria amebica e altre malattie parassitarie bloccando una di queste proteine perforanti. Scoprire come esaltare le capacità di perforazione nelle cellule

del sistema immunitario sarebbe ancora più importante perché potrebbe rivelarsi utile nella terapia del cancro e di malattie virali finora incurabili come l'AIDS.

Le cellule killer sono elementi del sistema immunitario cellulare, ma la loro azione può essere compresa solo nel contesto del sistema immunitario considera-



In questa serie di microfotografie elettroniche si vede una cellula killer che distrugge una cellula tumorale. Qui sopra un linfocito *T* citotossico (*in alto*) entra in contatto con una cellula bersaglio più piccola. Nella pagina a fronte, a sinistra, il danno è compiuto: la cellula bersaglio, con la membrana esterna perforata da una proteina secreta dalla cellula killer, si è svuotata: un flusso

to globalmente. (Per una descrizione più approfondita dell'argomento rinviamo al volume *Le difese immunitarie* a cura di Franco Celada, Le Scienze S.p.A Editore, Milano 1986.) Il sistema immunitario ha una componente umorale e una cellulare. Il sistema umorale difende l'organismo in primo luogo contro i batteri e le molecole tossiche. Le sue armi sono gli anticorpi, o immunoglobuline, che vengono sintetizzati e secreti da cellule particolari, i linfociti *B*. Ciascuno dei milioni di linfociti *B* sintetizza un particolare anticorpo in grado di riconoscere uno specifico antigene e lo espone alla sua superficie. Quando la cellula linfocitaria incontra una cellula batterica o una tossina caratterizzata dall'opportuno antigene, comincia a proliferare e alcuni dei linfociti suoi discendenti diventano «cellule memoria», ossia cellule capaci di rispondere allo stesso antigene più rapidamente in un'occasione successiva. La maggior parte dei discendenti, invece, si evolve in plasmacellule che sintetizzano e poi secernono una grande quantità di anticorpi. Gli anticorpi si legano agli antigeni e il legame fa precipitare le tossine o comunque le neutralizza in altro modo. Nel caso di una cellula che invade l'organismo, il legame dà luogo a una cascata di reazioni alla sua superficie, con la partecipazione di un gruppo di proteine del siero, note collettivamente come complemento. La cascata di rea-

zioni si conclude con la morte della cellula bersaglio.

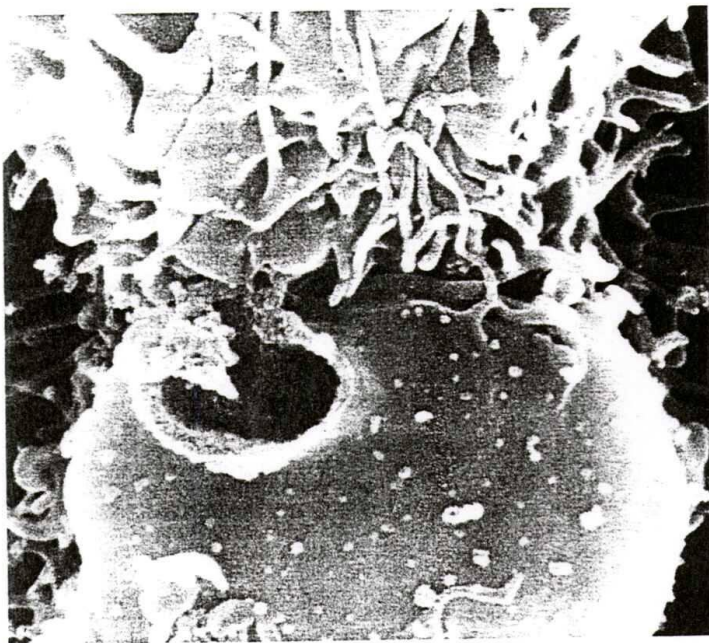
Gli stessi precursori cellulari che hanno dato origine ai linfociti *B* sono anche i capostipiti di una famiglia eterogenea di linfociti *T*, i quali costituiscono la base del sistema immunitario cellulare. Alcune cellule, i linfociti *Thelpe* e *T* soppressori, modulano sia il sistema umorale sia quello cellulare, principalmente secernendo messaggeri chimici, le linfocine. I principali elementi del sistema effetore cellulare sono i linfociti *T* citotossici, che abbiamo già ricordato. Il loro principale bersaglio sono le cellule infettate da virus. Anche l'altro tipo di cellule killer di cui si è già parlato, le cellule *NK* sono linfociti, ma non è chiara la loro derivazione precisa. Sembra, tuttavia, che siano strettamente legati ai linfociti *T* citotossici e si pensa che i loro principali bersagli siano le cellule tumorali e forse anche quelle infettate da agenti diversi dai virus.

Come per i linfociti *B*, la funzione dei linfociti *T* dipende in primo luogo dalla corretta individuazione del bersaglio appropriato. I linfociti *T* espongono alla superficie recettori specifici, molto simili agli anticorpi dei linfociti *B*. Questi recettori riconoscono certi antigeni presenti alla superficie delle cellule e si legano a essi. Però i linfociti *T* sono più selettivi dei linfociti *B*: riconoscono un antigene e vi si legano solo quando

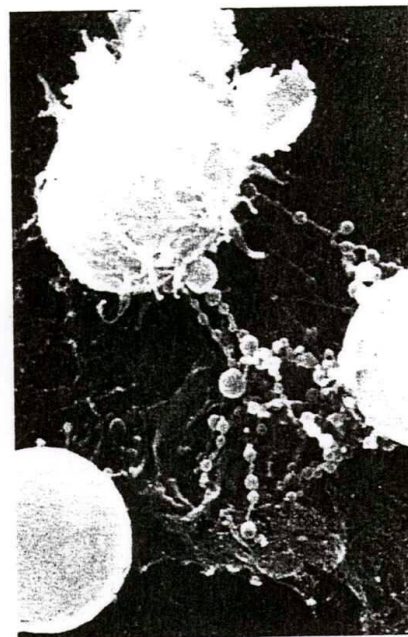
esso viene «presentato» da un elemento del «maggior complesso di istocompatibilità» (*MHC, major histocompatibility complex*), un gruppo di molecole di superficie. Le cellule *natural killer*, come dice il loro nome, sono meno selettive riguardo alle loro vittime: i loro recettori sono meno discriminanti e la loro azione non è vincolata al complesso *MHC*.

Non appena i linfociti *T* citotossici o le cellule *NK* hanno identificato il proprio bersaglio, si legano tenacemente a esso. Questo stretto contatto innesca il processo mortale e assicura, inoltre, che le cellule adiacenti non siano distrutte indiscriminatamente.

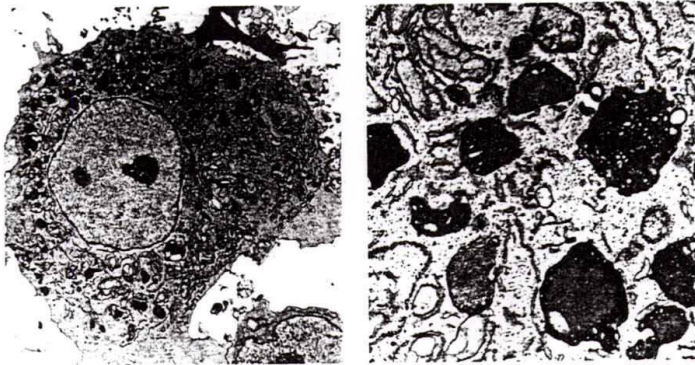
In buona parte tutto questo era già noto un decennio fa, ma la natura del processo distruttivo continuava a essere un mistero. I primi indizi per chiarirlo vennero scoperti all'inizio degli anni settanta da numerosi ricercatori, in particolare Eric Martz dell'Università del Massachusetts ad Amherst, Christopher S. Henney dell'Immunex Corporation a Seattle, William R. Clark dell'Università della California a Los Angeles, Pierre Golstein del Centre d'Immunologie di Marsiglia e Gideon Berke del Weizmann Institute of Science in Israele. Il loro lavoro ha permesso di suddividere il processo di distruzione messo in atto dalle cellule killer in tutta una successione di fasi distinte.



d'acqua penetrata nel suo interno l'ha fatta gonfiare come un palloncino; la membrana presenta una grossa cavità, mentre sono spariti molti dei villi che prima sporgevano. Nella microfotografia a destra, della cellula tumorale rimangono solo il nucleo e qualche frammento (l'altro



nucleo visibile è quello di una seconda cellula bersaglio). Le cellule sono state preparate da Chau-Ching Liu e le immagini al microscopio elettronico a scansione sono di Gilla Kaplan. L'ingrandimento è di 5700 diametri nelle prime due microfotografie e di 4200 diametri nella terza.



Nella microfotografia elettronica a sinistra, ottenuta dagli autori con Hans Hengartner e Eckhard R. Podack, un linfocito T citotossico in coltura è ingrandito di 1400 diametri. I granuli scuri di riserva nel citoplasma, ingranditi di 7600 diametri nella microfotografia a destra, hanno la membrana esterna opaca agli elettroni; la loro matrice amorfa contiene la proteina letale perforina.

In primo luogo è emerso che, quando la cellula linfocitaria e il suo bersaglio si uniscono, le loro membrane entrano in stretto contatto. Quindi viene inferto il colpo mortale alla cellula bersaglio e questo evento avvia una specie di «morte programmata» della cellula colpita: l'esito avviene cioè seguendo un piano predeterminato (purché siano presenti ioni calcio) anche se lo stretto legame si scinde e la cellula killer si allontana per iniziare un nuovo ciclo distruttivo.

Henney e Martz sono stati tra i primi a suggerire che i linfociti uccidano il proprio bersaglio danneggiandone in qualche modo la membrana plasmatica (esterna). Essi hanno proposto una simile ipotesi dopo aver osservato che molecole radioattive introdotte in cellule bersaglio come marcatori fuoriescono rapidamente da esse quando vengono attaccate dai linfociti. La membrana diventa permeabile solo a marcatori che non superino una certa dimensione, suggerendo così che il danno alla membrana si espliciti sotto forma di perforazioni.

Da semplice possibilità, l'ipotesi ha iniziato a consolidarsi nel 1980. Robert R. Dourmashkin e Pierre Henkart del National Cancer Institute, assieme ai loro collaboratori, hanno esaminato la superficie di cellule bersaglio lese in microfotografie elettroniche, con ingrandimenti di molte migliaia di diametri, e hanno scoperto nella membrana strutturali ad anello, che sembravano fori. Questo risultato è stato completato tre anni dopo da Eckhard R. Podack del New York Medical College e da Gunther Dennert della School of Medicine della University of Southern California, che hanno studiato l'effetto di cellule killer in coltura su cellule tumorali, stabilendo che la superficie delle cellule bersaglio risultava butterata da fori il cui diametro interno variava da cinque a 20 nanometri (milionesimi di millimetro).

Non era affatto chiaro, però, se i fori fossero stati praticati direttamente dai linfociti oppure se fossero semplicemente la manifestazione terminale di morte cellulare causata da qualche altra forma di lesione. La ricerca di una soluzione fu ostacolata a lungo dalla mancanza di una fonte di rapido approvvigionamento di cellule killer. Finalmente, nel 1977, Steven Gillis dell'Immunex, Kendall A. Smith della Dartmouth Medical School e il gruppo di Robert C. Gallo del National Cancer Institute sono riusciti a coltivare in laboratorio linfociti di topo, e, in particolare, sia linfociti T citotossici sia cellule NK. Il segreto del loro successo è stato quello di aver identificato le particolari sostanze nutritive e i fattori di accrescimento che queste cellule in coltura richiedono per la loro sopravvivenza. È risultato che un fattore chiave era una linfocina e precisamente l'interleuchina-2. La coltivazione *in vitro* ha permesso di ottenere cloni di linfociti da cellule staminali note, in modo da poter disporre di una fonte abbondante e omogenea di linfociti T citotossici e di cellule NK con caratteristiche ben precise. La via per un'analisi particolareggiata di queste cellule è stata poi spianata dagli strumenti messi a disposizione dalla biologia cellulare e dalla biochimica.

Nei linfociti era stata osservata una caratteristica morfologica che richiedeva di essere analizzata. Le microfotografie elettroniche avevano rivelato la presenza nel citoplasma di numerosi organelli (elementi subcellulari) piccoli e scuri: si trattava dei granuli di riserva, strutture idonee ad accumulare una sostanza sintetizzata dalla cellula in modo da poterla liberare rapidamente in grandi quantità al momento giusto. La liberazione avviene per esocitosi: i granuli si portano alla periferia della cellula dove si fondono con la membrana plasmatica per poi scaricare il proprio contenuto.

Diversi ricercatori avevano osservato che, in una fase precoce del processo di uccisione della cellula, i granuli di una cellula killer si concentrano nella parte che è in stretto contatto con la cellula bersaglio. In seguito Abraham Kupfer e S. Jonathan Singer dell'Università della California a San Diego e Dennert hanno notato che l'apparato di Golgi, addetto al «montaggio» dei granuli, sembra dirigersi verso la regione di contatto tra le due cellule e che, non appena questo è stato stabilito, numerose proteine del citoscheletro (l'impalcatura filamentosa della cellula) si «riorientano» in direzione della cellula bersaglio, fornendo la forza motrice necessaria allo spostamento dell'apparato di Golgi e dei granuli.

Il riorientamento del citoscheletro e lo spostamento delle pile di cisterne dell'apparato di Golgi e dei granuli avvengono solo quando e dove i linfociti si legano a un bersaglio appropriato. Roger Y. Tsien dell'Università della California a Berkeley ha dimostrato che il legame induce un incremento esplosivo di ioni calcio nella cellula e questo innesca l'esocitosi. Da parte loro, John H. Yanelli e Victor H. Engelhard dell'Università della Virginia hanno seguito mediante microcinematografia il riorientamento dei granuli nel citoplasma e poi la loro fusione con la membrana plasmatica.

Tutto sommato vi erano prove sufficienti a suggerire che il contatto con un bersaglio appropriato inducesse la cellula killer a puntare verso di esso il proprio apparato secernente e a lanciarlo contro un agente letale contenuto nei granuli. Era dunque necessario in primo luogo stabilire se i granuli fossero effettivamente i bossoli del proiettile e, in secondo luogo, identificare il proiettile stesso.

Il primo compito è stato quello di isolare i granuli e di vedere se, da soli, erano in grado di uccidere. Il lavoro è stato compiuto nel 1984 da Henkart e Podack e, indipendentemente, dal nostro gruppo. A questo scopo abbiamo sfruttato le varie tecniche di frazionamento subcellulare il cui obiettivo consiste nel suddividere una cellula nei suoi componenti e nel trovare quale componente contenga un particolare enzima o esegua una determinata funzione: le cellule killer vengono frammentate sottoponendole a pressione in atmosfera di azoto, successivamente i frammenti cellulari sono fatti stratificare in un gradiente di densità costituito da particelle inerti e poi centrifugati ad alta velocità. In questo modo i vari organelli sedimentano, in base alla loro densità, in bande separate. Quindi abbiamo esaminato ogni frazione al microscopio elettronico e ne abbiamo verificato l'attività enzimatica e la capacità citotossica.

Una frazione, che al microscopio elettronico appariva quasi interamente costituita da granuli, presentava un elevato livello di attività di certi enzimi ed aveva attività fortemente citotossica: quando i

granuli isolati venivano mescolati con emazie o con cellule tumorali in un mezzo contenente ioni calcio, le cellule morivano in pochi minuti. Le microfotografie elettroniche mostravano una superficie cellulare con lesioni ad anello, praticamente indistinguibili da quelle prodotte da cellule killer intatte. È stato così dimostrato che i granuli contengono effettivamente la secrezione letale delle cellule killer.

Anche il prodotto della secrezione è stato ben presto identificato. Nel 1985, in collaborazione con Podack e con Hans Hengartner del Policlinico di Zurigo, abbiamo trovato una proteina che da sola (purché posta in presenza di ioni calcio), riproduce nella membrana le lesioni osservate al microscopio elettronico e uccide le cellule come fanno le cellule killer intatte e i granuli. L'abbiamo purificata facendo passare attraverso colonne cromatografiche estratti di granuli. Le proteine in essi contenute sono state separate in base alla carica elettrica e alla massa molecolare: sono state poi selezionate per la capacità di lisare i globuli rossi, cioè di romperne la membrana facendoli scoppiare. La proteina killer è stata isolata indipendentemente anche da Danielle Masson e da Jürg Tschopp dell'Università di Losanna.

Finora nei granuli dei linfociti *T* citotossici e delle cellule *NK* è stato trovato soltanto un tipo di proteina perforante battezzata per questo motivo «perforina». La sua massa molecolare è di 70 000 dalton. Quando le cellule sono esposte a essa, in presenza di ioni calcio, vengono lisate in pochi minuti. D'altra parte, se si aggiungono ioni calcio alla perforina appena prima che essa entri in contatto con le cellule, la sua attività distruttiva viene annullata. Questo effetto appare paradossale, ma in realtà chiarisce molto bene come la proteina uccida le cellule.

Le molecole da 70 000 dalton, secrete da una cellula killer, si inseriscono nella membrana della cellula bersaglio. Qui, in presenza di ioni calcio, le singole molecole (monomeri) polimerizzano, cioè si uniscono l'una con l'altra. Il polimero può assumere varie forme, ma in condizioni ottimali il prodotto finale assomiglia a un cilindro. Al microscopio elettronico, quando è visto in sezione trasversale, sembra un anello, mentre in sezione longitudinale appare come due linee parallele. Un anello completo, come hanno notato per primi Podack e Dennert, ha un diametro interno compreso tra cinque e 20 nanometri.

Affinché la perforina possa danneggiare una cellula bersaglio, è necessario che la polimerizzazione mediata dal calcio abbia luogo interamente all'interno della membrana cellulare. La ragione è che soltanto il monomero di perforina riesce a inserirsi nella membrana; se la polimerizzazione ha luogo in soluzione, cioè fuori da una membrana, il polimero risultante non riesce a penetrare nella

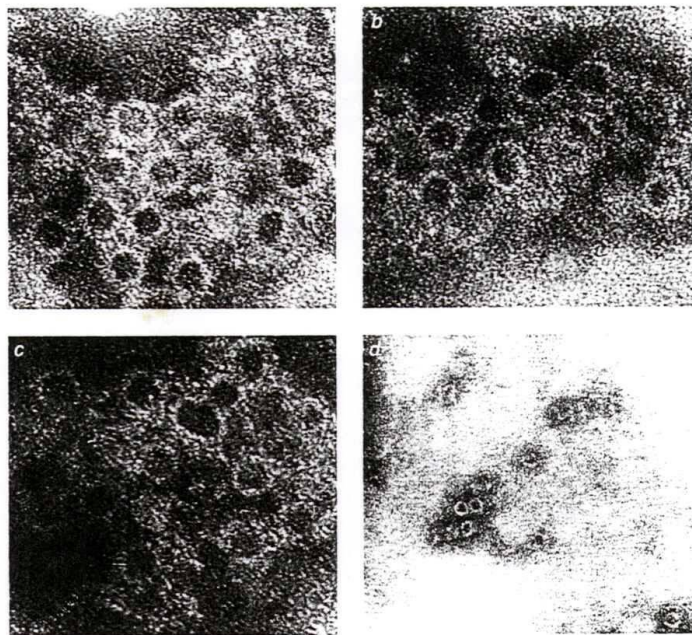
membrana e, quindi, a uccidere la cellula. L'effetto protettivo si intuisce facilmente: la perforina secreta che si riversa nello spazio extracellulare o nel circolo sanguigno, dove il calcio è abbondante, polimerizza immediatamente e viene resa inattiva, eliminando così in pratica la possibilità che si abbia un danno accidentale a carico di cellule non bersaglio.

In una cellula bersaglio, invece, i canalicoli prodotti nella membrana dalla polimerizzazione provocano modificazioni rapide e misurabili nella cellula stessa. La membrana plasmatica trattiene all'interno della cellula vivente (tranne quando devono essere secrete) proteine e altre grosse molecole; inoltre, tiene separati differenti ioni, mantenendone alcuni all'interno e altri all'esterno della cellula. La separazione fra ioni positivi e negativi ai due lati della membrana stabilisce un potenziale elettrico transmembrana. Quando la membrana «perde», gli ioni e l'acqua tendono a trasferirsi seguendo i loro gradienti elettrochimici fino a raggiungere l'equilibrio e, pertanto, vi è una caduta del potenziale di membrana. Se i fori nella membrana sono di dimensione limitata, si instaura inoltre l'effetto Donnan: le grosse molecole all'interno della membrana non riescono ad attraversarla, mentre l'acqua e i sali del liquido extracellulare si riversano attraverso la membrana nel lato in-

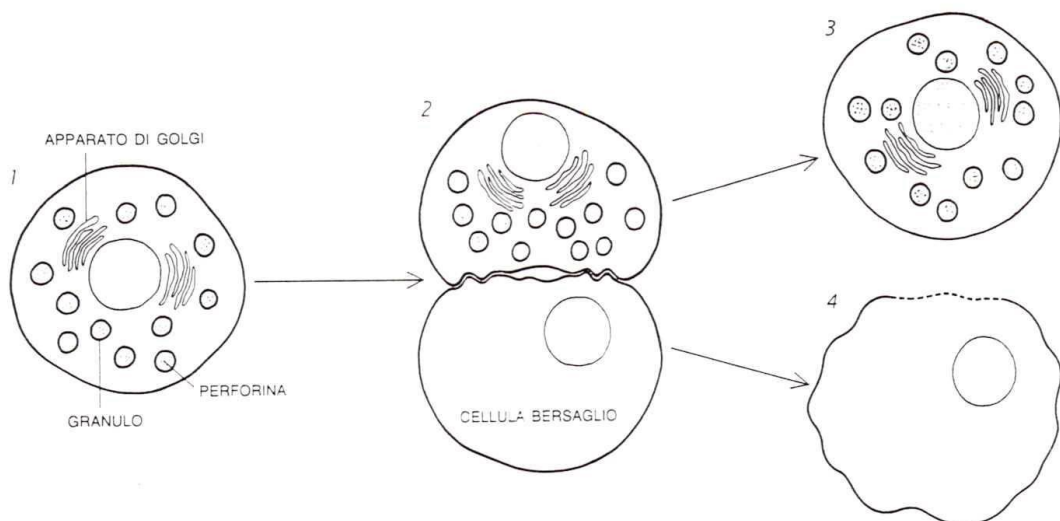
tracellulare dove si trovano le proteine. La cellula si rigonfia e scoppia.

Fissando microelettrodi su cellule bersaglio, siamo riusciti a misurare una caduta significativa del potenziale di membrana subito dopo che era stata somministrata perforina. Grazie ad apparecchiature elettroniche ultrasensibili siamo stati in grado addirittura di misurare la corrente ionica che passa attraverso i singoli canalicoli. I nostri risultati sono stati conformi alle previsioni per l'effetto Donnan. Inoltre, le misurazioni hanno dimostrato che i canalicoli prodotti dalla perforina sono strutture stabili che si conservano come passaggi aperti nella membrana. Determinando esattamente quali ioni e piccole molecole attraversano la membrana lesa, abbiamo potuto stimare che il diametro interno funzionale dei canali varia da uno a 10 nanometri (in contrasto con il diametro osservato nelle microfotografie, che variava da cinque a 20 nanometri).

Data la chiara mancanza di selettività della perforina quale agente di distruzione, come si può spiegare la specificità d'azione dei linfociti killer? Abbiamo accennato al fatto che l'uccisione accidentale di cellule da parte della perforina che sfugge dall'interfaccia tra la cellula linfocitaria e la cellula bersaglio viene impedita dalla polimerizzazione della

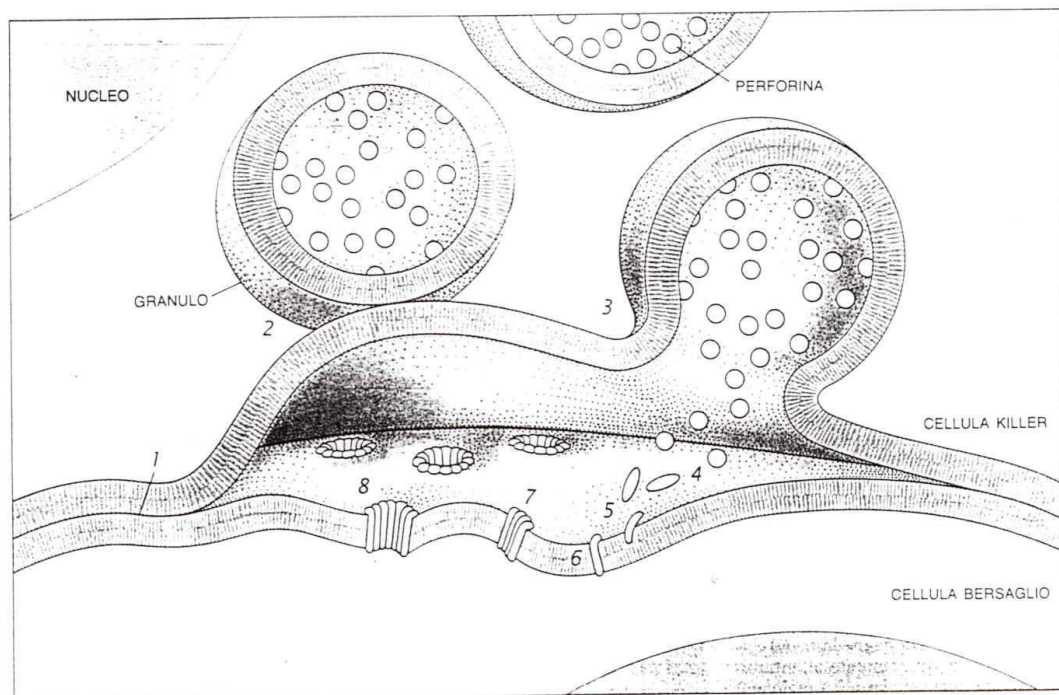


Le lesioni che uccidono le cellule sono perforazioni tubulari, con un diametro interno che varia da cinque a 20 nanometri (milionesimi di millimetro), visibili nelle microfotografie elettroniche di membrane colorate in negativo come anelli o linee parallele a seconda dell'orientazione. Il loro aspetto cambia di poco sia che vengano prodotte da linfociti integri (a), da granuli isolati (b) o da perforina purificata da granuli (c). Perforazioni più piccole (con diametro variabile da due a tre nanometri) sono prodotte da una proteina isolata dall'ameba *Entamoeba histolytica* (d).



Già da tempo sono stati identificati gli stadi che entrano a far parte del processo di uccisione. La cellula killer (1) riconosce la cellula bersaglio ed entra in stretto contatto con essa (2). Quando il contatto è stato stabilito, l'apparato di Golgi e i granuli che esso produce si riorientano, all'interno della cellula killer, in direzione del bersaglio. A questo punto

viene liberata la perforina, che va a produrre una serie di fori nella membrana della cellula bersaglio (si veda l'illustrazione in basso). Lanciati i suoi «missili» letali, la cellula killer si ritrae e va a uccidere un'altra cellula (3); dopo una sequenza «programmata» di eventi, la cellula bersaglio danneggiata muore nel giro di pochi minuti (4).



Recentemente sono stati chiariti i particolari del processo di uccisione. Un aumento di ioni calcio nel linfocita, apparentemente innescato dal legame della cellula killer con la cellula bersaglio, mediato da un recettore (1), provoca il fenomeno dell'esocitosi mediante il quale i granuli si fondono con la membrana cellulare (2) e scaricano la perforina (3)

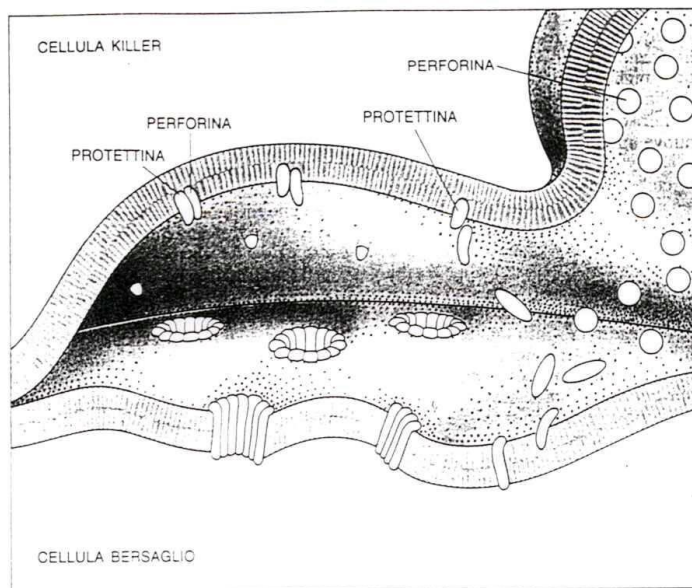
nello spazio intercellulare adiacente alla cellula bersaglio. Qui il calcio modifica la conformazione delle molecole di perforina (4). Esse si legano alla membrana della cellula bersaglio (5) e vi si inseriscono (6). I monomeri polimerizzano come le doghe di una botte (7) e formano canali (8) che lasciano passare acqua e sali portando a morte la cellula.

perforina stessa indotta dal calcio. D'altra parte non si sono mai osservate quelle che si potrebbero definire uccisioni intenzionali di cellule che non sono bersaglio d'elezione (come conseguenza di un contatto casuale) grazie alla capacità dei linfociti di riconoscere le cellule appropriate, per esempio quelle che espongono sulla superficie antigeni virali o tumorali. In altri termini, la specificità dell'uccisione risiede esclusivamente nella necessità di uno stretto contatto, che dipende a sua volta dal legame della cellula killer con la cellula bersaglio attraverso l'interazione degli antigeni presenti sulla cellula bersaglio con i recettori della cellula killer.

Che cosa impedisce alla cellula killer di uccidere se stessa? Non può certo essere la necessità di uno stretto contatto, dato che la membrana della cellula killer è continuamente e direttamente esposta alla perforina secreta. Di recente, Chau-Ching Liu, un laureando che lavora nel nostro laboratorio, e uno di noi (Young) collaborando con Clark, hanno dimostrato che anche la perforina purificata non uccide né le cellule *T* citotossiche né le cellule *NK*. Questo meccanismo autoprotettivo non è noto, ma possiamo avanzare un'ipotesi: pensiamo che la membrana delle cellule killer incorpori una proteina speciale, che chiamiamo protettina e che è molto simile alla perforina. Questa stretta omologia promuoverebbe una specie di «polimerizzazione erranea»: la protettina si combinerebbe rapidamente con qualunque monomero di perforina che giungesse in corrispondenza della membrana della cellula killer, impedendo o l'inserimento in essa della perforina o la normale polimerizzazione perforina-perforina, che provoca la formazione del canalicolo. Siamo tuttora impegnati in un'intensa ricerca della nostra ipotetica proteina.

Tutti gli studi effettuati di recente e da noi descritti in questo articolo sono stati realizzati con linfociti di topo coltivati *in vitro*. Si poteva pensare che la perforina fosse soltanto una curiosità di laboratorio e non l'arma dei linfociti *in vivo*. In collaborazione con Bice Perussia del Wistar Institute di Filadelfia e con Liu, abbiamo cercato la perforina in linfociti appena separati da sangue umano e non ne abbiamo trovata. Quando i linfociti venivano stimolati con interleuchina-2 *in vitro*, invece, proliferavano e cominciavano a sintetizzare perforina. Abbiamo ottenuto questo risultato sia con i linfociti *T* citotossici sia con le cellule *NK*; analoghi risultati sono stati riferiti da Leora S. Zalman e Hans J. Muller-Eberhard e collaboratori del Research Institute della Scripps Clinic. L'effetto *in vitro* dell'interleuchina-2 riflette probabilmente ciò che essa provoca nell'organismo, dove l'interleuchina è prodotta dai linfociti *T helper* e promuove tutta una gamma di risposte immunitarie.

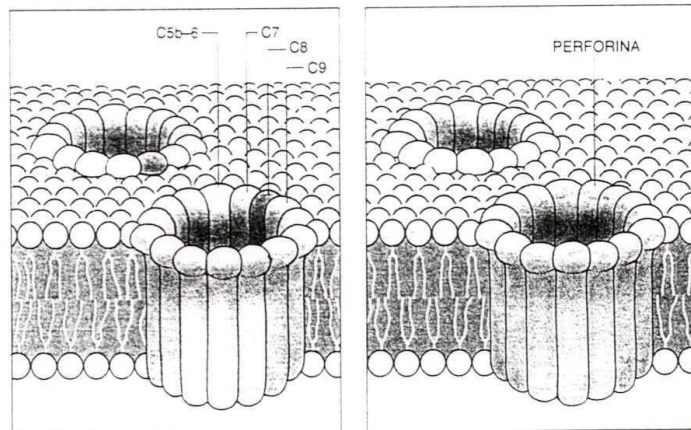
In verità, ciò che abbiamo notato in laboratorio può spiegare l'attività clinica



Gli autori hanno ipotizzato un meccanismo protettivo capace di impedire a una cellula killer di autosopprimersi. Essi ritengono che una proteina molto simile alla perforina, la protettina, sia concentrata nella membrana della cellula killer: i monomeri di perforina si legherebbero alla protettina, non riuscendo più quindi a polimerizzare e a formare le perforazioni nella membrana.

dell'interleuchina-2 osservata e descritta per la prima volta nel 1984 da Steven A. Rosenberg del National Cancer Institute. Rosenberg ha ideato una nuova terapia per alcune forme incurabili di cancro. Dal sangue di un paziente vengono

estratti linfociti che sono poi stimolati con interleuchina-2 al di fuori dell'organismo e, infine, reintrodotti nel malato. È verosimile che siano attivati per poter uccidere meglio e in alcuni pazienti, infatti, è stata osservata una certa regres-



Il sistema immunitario umorale forma canalicoli molto simili a quelli prodotti dai linfociti killer del sistema immunitario cellulare. Il legame tra anticorpi e una cellula bersaglio innesca una cascata di reazioni in cui varie proteine del sistema denominato complemento sono via via attivate. Alla fine, la proteina C5b-6 si lega alla membrana superficiale della cellula bersaglio, dopodiché le proteine C7, C8 e numerose molecole di proteina C9 si aggregano a formare un canalicolo (a sinistra). Al contrario, le perforazioni prodotte dalle cellule killer si formano per autoaggregazione di un unico tipo di subunità: i monomeri di perforina (a destra).

sione tumorale. Il procedimento è tuttavia fortemente tossico e per ora viene utilizzato solo in via sperimentale, ma una miglior comprensione di come far produrre perforina ai linfociti killer contribuirà certamente alla messa a punto di nuove immunoterapie per il cancro.

Sembra chiaro che le cellule killer ucidano le cellule bersaglio perforandone la membrana plasmatica, ma esse possono disporre anche di altri mezzi di offesa. John H. Russell della Washington University a St. Louis ha proposto un modello di «disintegrazione interna» per spiegare l'evento letale. Il modello si basa sull'osservazione che in una fase precoce dell'evento che colpisce la cellula bersaglio la membrana che racchiude il nucleo cellulare si rompe e il DNA del nucleo si frammenta. Russell e altri ritengono che la morte della cellula bersaglio dipenda dalla frammentazione del DNA, presumibilmente innescata da un segnale emesso dalla cellula killer. Il modello non è stato elaborato nei particolari, ma non può essere escluso. Forse esistono diversi meccanismi di uccisione.

In effetti, abbiamo trovato che certe linee cellulari costituite da linfociti T citotossici, coltivate *in vitro* per un certo tempo, continuano a esercitare un'attività letale anche se non secernono perforina. Secernono forse qualcosa d'al-

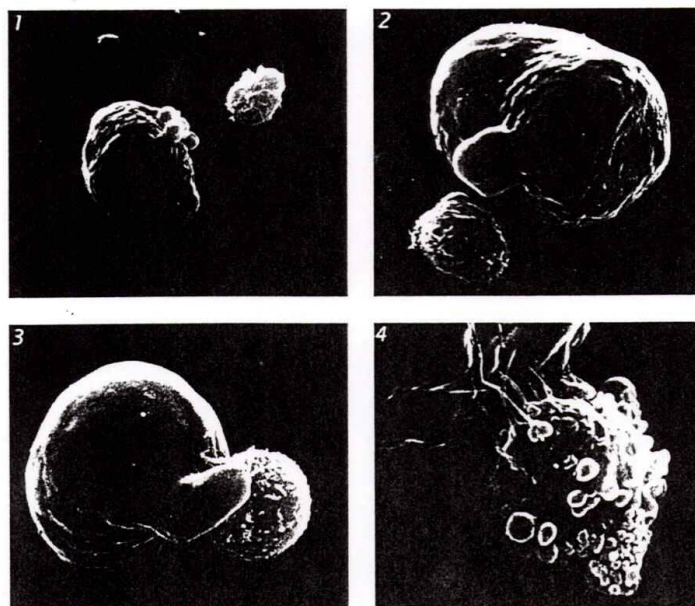
tro? Disponiamo di alcuni dati preliminari secondo cui nelle cellule killer sarebbe presente una molecola, nota come leucalessina, che uccide le cellule nello spazio di diverse ore e non di minuti. Può darsi che i canalicoli di perforina, sebbene lascino passare inizialmente solo sali e acqua, essendo troppo piccoli per essere attraversati dalla maggior parte delle proteine, alla fine si allarghino in misura tale (per ulteriore polimerizzazione) da far entrare la catena di una proteina, forse la leucalessina, che scinde il DNA. In alternativa, la formazione dei canalicoli potrebbe portare alla fine all'ingresso nella cellula di una proteina che scinde il DNA promuovendo in qualche modo un'endocitosi, cioè quel processo mediante il quale, in generale, le grosse molecole sono assunte all'interno delle cellule.

Probabilmente la formazione di canalicoli non è l'unico meccanismo dei linfociti killer, ma è chiaro che si tratta di un metodo efficiente per uccidere le cellule bersaglio, tanto che figura sia nell'immunità umorale sia in quella cellulare: esso è infatti il risultato finale della cascata di reazioni a cui partecipa il complemento e che porta a morte i batteri marcati da anticorpi. Le proteine terminali della cascata di reazioni polimerizzano formando canalicoli molto simili a quelli prodotti dalla perforina e con un

diametro interno di 10 nanometri. Podack e il nostro gruppo hanno scoperto, come ha fatto indipendentemente Tschopp, che le proteine terminali che costituiscono il complemento possiedono un'omologia significativa con la perforina: la sequenza degli amminoacidi (cioè delle unità costitutive delle proteine) è identica in alcune parti di queste proteine del complemento e della perforina. Questa somiglianza tra elementi dei sistemi immunitari umorale e cellulare non può essere accidentale. Abbiamo formulato l'ipotesi che le proteine killer di entrambi i sistemi abbiano un'origine comune, ma che si siano in qualche modo differenziate in un secondo tempo per specializzarsi nei rispettivi ruoli. Una volta che un meccanismo efficiente si evolve in un organismo, tende a conservarsi per selezione naturale.

L'uccisione di cellule non è limitata alle cellule del sistema immunitario, o anche agli organismi di maggiore complessità. In realtà numerose specie, comprendenti certi batteri, funghi e protozoi parassiti, sono efficientissimi killer di cellule. Tra gli strumenti di offesa che molti di essi hanno in comune vi sono proteine che perforano la superficie delle cellule bersaglio. Nel tentativo di capire meglio come i linfociti uccidano le loro cellule bersaglio abbiamo scelto una di queste specie di organismi inferiori: certi ceppi virulenti di un'ameba, *Entamoeba histolytica*, infettano in tutto il mondo gli esseri umani, invadendone l'intestino e provocando una grave forma di dissenteria; spesso si diffondono anche in altri organi. In una coltura *in vitro*, questi ceppi uccidono un'ampia gamma di cellule, legandosi, comunque, come prima cosa alla cellula bersaglio.

Nel 1982, Carlos Gitler del Weizmann Institute e il nostro gruppo, indipendentemente, hanno isolato da *E. histolytica* una proteina che forma canalicoli nella membrana superficiale delle cellule bersaglio. Una volta purificata, questa proteina perforante risulta un killer efficientissimo. L'abbiamo chiamata in un primo tempo con la sigla PFP (dall'inglese *pore-forming protein*); essa è molto più piccola della perforina (ha, infatti, una massa molecolare di soli 14 000 dalton), ma come la perforina polimerizza e forma grosse lesioni tubulari, con un diametro interno che varia da due a tre nanometri, nella membrana cellulare. Riteniamo che l'ameba uccida le proprie cellule bersaglio legandosi inizialmente a esse e perforandone in seguito la membrana con canalicoli fatti di PFP polimerizzata. La somiglianza tra i meccanismi di uccisione messi in atto da cellule killer che attaccano l'organismo e cellule killer che lo difendono sembrerebbe un bell'esempio di convergenza evolutiva. L'ameba e i linfociti umani hanno sviluppato indipendentemente proteine perforanti simili sotto il profilo funzionale e che realizzano lo stesso obiettivo: l'uccisione di cellule.



Un'ameba parassita (*Entamoeba histolytica*) può uccidere una cellula con una proteina perforante che ha lo stesso effetto della perforina. In queste microfotografie elettroniche a scansione di Gilla Kaplan, l'ameba, più grande, si avvicina (1) alla cellula bersaglio, un macrofago del sistema immunitario ed emette uno pseudopodio (2). Entrata in contatto con essa, può ucciderla per fagocitosi, o ingestione (3), oppure può secernere una proteina perforante letale, che fa gonfiare la cellula bersaglio, con la formazione di bolle o vesciche sulla superficie (4), e la porta a morte.

Come le cellule elaborano gli antigeni

Le cellule del sistema immunitario attivano le difese dell'organismo esponendo in superficie complessi molecolari costruiti a partire da frammenti proteici propri e appartenenti ad agenti patogeni estranei

di Victor H. Engelhard

Tutti gli organismi pluricellulari possiedono almeno un primitivo sistema di difesa che distingue gli agenti patogeni estranei dai componenti dell'organismo e li elimina. Oltre a ciò, i vertebrati superiori hanno evoluto un sistema immunitario più avanzato che è in grado di distinguere gli agenti patogeni e di scegliere risposte appropriate a ciascuno di essi. Il vantaggio di questa immunità specifica è che il sistema immunitario può adattarsi rapidamente agli agenti infettivi che incontra con maggiore frequenza.

In un vertebrato, la sorveglianza condotta dal sistema immunitario a livello biomolecolare si basa sulla ricerca degli antigeni - molecole bersaglio immunologiche - che segnalano la presenza di un invasore. Gli antigeni non sono semplicemente parti di un agente patogeno, ma sono spesso molecole costruite dalle cellule dell'ospite a partire da frammenti delle proteine dell'invasore e da proteine cellulari facenti parte del maggior complesso di istocompatibilità (MHC). L'elaborazione e il montaggio degli antigeni sono la chiave della flessibilità, della specificità e della vastità di azione del sistema immunitario.

La «costruzione» degli antigeni e la loro presentazione sulla superficie cellulare, dove il sistema immunitario può esaminarli, sono fenomeni complessi, di cui si conoscono già in dettaglio molte fasi. È interessante notare come l'elaborazione degli antigeni sia strettamente legata ai meccanismi che sintetizzano e riciclano tutte le proteine all'interno delle cellule e le trasportano da un comparto intracellulare all'altro. Una conoscenza più approfondita dell'elaborazione degli antigeni potrà quindi chiarire ciò che succede a livello molecolare non solo all'interno delle cellule malate, ma anche di quelle sane, e contribuire alla messa a punto di migliori terapie

per un gran numero di patologie, dalle infezioni al cancro.

Prima di illustrare i meccanismi attraverso cui vengono elaborati gli antigeni, può essere utile riepilogare alcuni aspetti del funzionamento del sistema immunitario. Per produrre risposte specifiche, il sistema immunitario impiega un'ampia popolazione di globuli bianchi del sangue, i linfociti. Questi possiedono sulla loro superficie recettori che si legano con elevata affinità agli antigeni. Ciascun linfocita esprime recettori di struttura leggermente diversa, e di conseguenza è specifico per un ben determinato tipo di antigene. Gli immunologi stimano che in un essere umano la popolazione di linfociti esprima più di 100 milioni di recettori distinti per gli antigeni. Questo repertorio permette al sistema immunitario di reagire con estrema specificità a quasi tutti gli antigeni estranei.

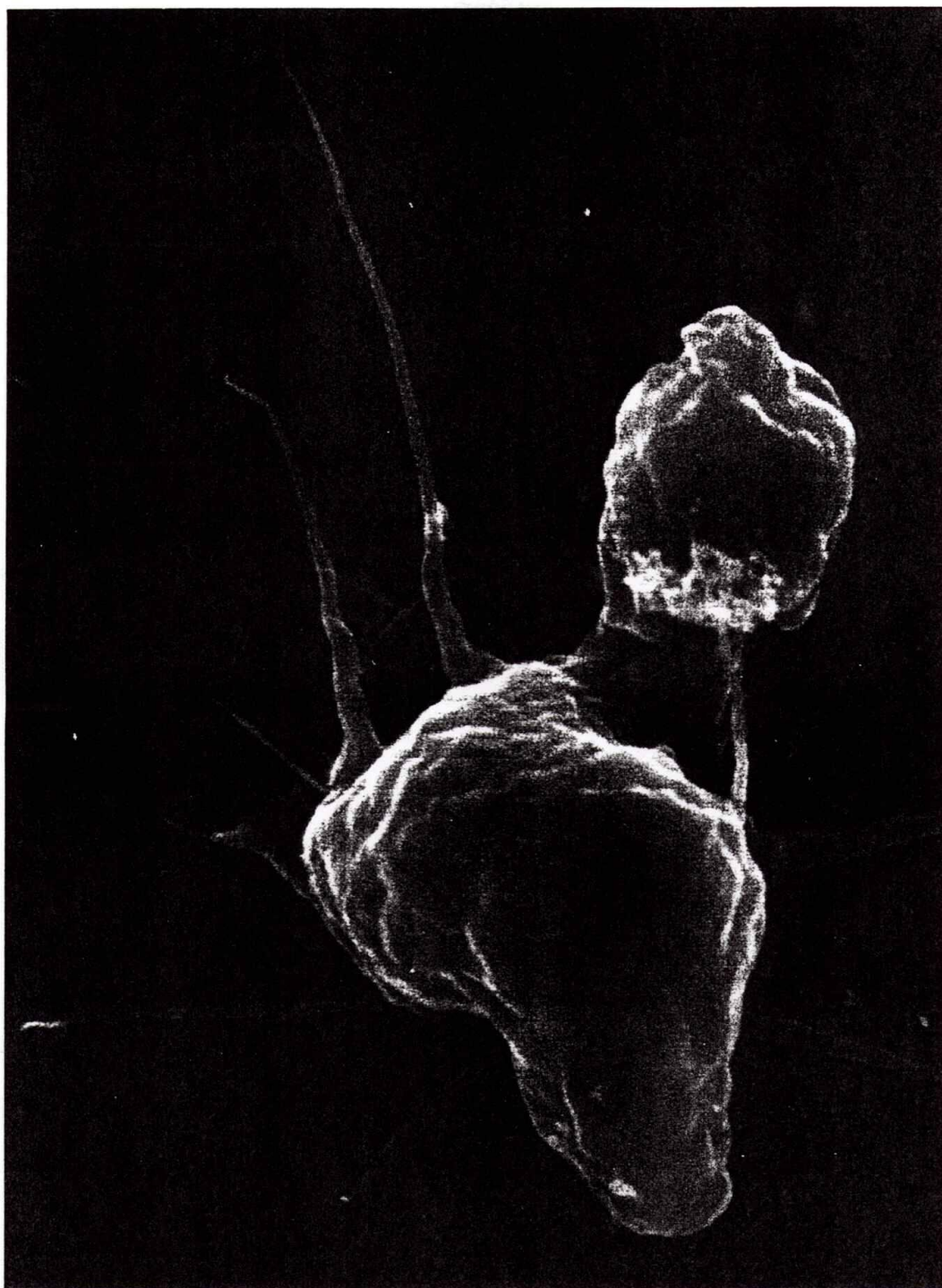
Il sistema immunitario regola la qualità della propria risposta in base alla natura dell'agente patogeno e al modo in cui esso invade l'organismo. Molti batteri e grandi parassiti come i vermi provocano infezioni negli spazi extracellulari dell'organismo, quali il circolo sanguigno o il lume intestinale. Per controllare questi agenti patogeni, il sistema immunitario dispiega recettori per gli antigeni solubili, chiamati anticorpi, che sono prodotti dai linfociti B. Gli anticorpi si legano direttamente a un parassita e forniscono un bersaglio per l'azione distruttiva di altre molecole e cellule immunitarie.

I virus e molti altri batteri e protozoi, come quelli che causano la malaria, la malattia del sonno e la leishmaniosi, sono più difficili da combattere in quanto provocano infezioni nelle cellule dell'ospite, dove gli anticorpi non li possono raggiungere. Per combattere questi

organismi, deve entrare in azione un altro schieramento del sistema immunitario. Tutte le cellule dell'ospite portano molecole MHC in superficie. Nelle cellule infettate, le molecole MHC si legano a piccoli peptidi, o frammenti di proteine, che provengono dal parassita, e li espongono alla superficie cellulare. I complessi di peptidi del parassita e molecole MHC dell'ospite formano gli antigeni che possono essere riconosciuti dai recettori presenti sui linfociti T citotossici (*killer*). I linfociti T possono così identificare e distruggere selettivamente le cellule infettate, risparmiando quelle sane. Una funzione dei complessi peptide-MHC è dunque quella di segnalare che la cellula è infettata.

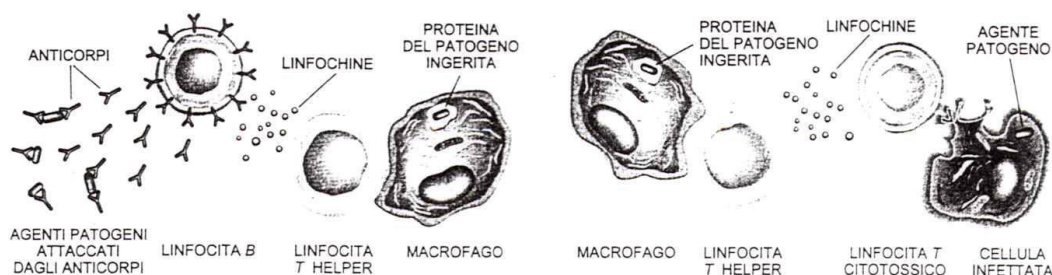
I complessi peptide-MHC sono importanti anche nella regolazione della risposta immunitaria. Cellule specializzate, come i macrofagi, percorrono l'organismo ingerendo i materiali extracellulari che incontrano, degradandoli per produrre peptidi e presentando questi ultimi come antigeni. Le cellule che espongono gli antigeni si spostano dai siti di infezione ai linfonodi, dove reclutano linfociti per la risposta immunitaria; in effetti le cellule che presentano gli antigeni sono come messaggeri provenienti dalla prima linea di una battaglia. Quando i linfociti T *helper* riconoscono un complesso peptide-MHC su queste cellule, secernono molecole simili a ormoni (le linfocine) che promuovono il differenziamento delle cellule del sistema immunitario.

Così, il riconoscimento di un complesso peptide-MHC sulla superficie di una cellula è un evento fondamentale nell'attivazione di tutte le risposte immunitarie e, in particolare, nell'eliminazione dei parassiti intracellulari. Negli ultimi 20 anni, immunologi di tutto il mondo hanno cercato di scoprire come si forma il complesso fra una molecola



Un macrofago ingerisce batteri nel corso della risposta immunitaria a un'infezione. All'interno di questi globuli bianchi del sangue le proteine batteriche vengono degradate a peptidi e presentate come antigeni da molecole specializzate

che si trovano sulla superficie cellulare. Negli ultimi decenni sono stati gradualmente compiuti molti passi avanti nella comprensione dei processi attraverso i quali le cellule trasformano in antigeni sia le proteine proprie sia quelle estranee.



Il riconoscimento degli antigeni regola la risposta immunitaria. Quando i linfociti *T helper* riconoscono un complesso antigenico su una cellula specializzata nel presentare l'antigene, come un macrofago, liberano molecole che fungono da segnale, le linfo-

chine. Esse inducono i linfociti *B* a produrre anticorpi contro i batteri extracellulari (a sinistra) o i linfociti *T* citotossici ad attaccare le cellule infettate (a destra). I complessi antigenici consentono anche ai linfociti *T* citotossici di identificare i bersagli.

MHC e un peptide. Questi studi hanno chiarito come la struttura delle molecole MHC permetta loro di legarsi a molti peptidi diversi della gamma quasi infinita di agenti infettivi che l'organismo può incontrare.

Le molecole MHC vennero scoperte da studiosi che lavoravano sul trapianto di tessuti. Negli anni trenta George D. Snell dei Jackson Laboratories di Bar Harbor e Peter A. Gorer del Lister Institute of Preventive Medicine in Inghilterra descrissero un locus, o posizione genica, sul cromosoma 17 del topo, che era il fattore primario nel determinare se tessuti trapiantati da un ceppo di topo a un altro sarebbero stati accettati o rigettati. Essi denominarono questo locus *H-2*. (La *H* sta per «istocompatibilità» in inglese.) Un locus analogo nell'uomo venne definito negli anni cinquanta da Jean Dausset dell'Università di Parigi.

Ulteriori ricerche dimostrarono che *H-2* conteneva molti geni che codificano per antigeni di trapianto, ossia proteine che sono espresse alla superficie delle cellule e possono essere riconosciute dal sistema immunitario. Il termine «maggior complesso di istocompatibilità» venne coniato per riflettere l'importanza di questo gruppo di geni strettamente correlati nel rigetto o nell'accettazione di un trapianto. (Storicamente le versioni umane di queste molecole sono spesso state chiamate HLA, da *human leukocyte antigen*, ma il termine MHC è ora generalmente accettato.)

Studi strutturali hanno accertato che gli antigeni di trapianto codificati dai geni MHC appartengono a due tipi fondamentali, denominati classe I e classe II. Ciascuna classe dell'MHC è altamente diversificata: le popolazioni umane e murine contengono più di 100 forme di queste molecole, sebbene un singolo individuo ne esprima generalmente da tre a sei per ciascuna classe.

La funzione fisiologica delle molecole MHC divenne chiara alla fine degli anni sessanta. Lavorando indipendentemente, Baruj Benacerraf della New York University e Hugh O. McDevitt

(prima in Israele e poi alla Harvard University) trovarono che certi esemplari di cavia e di topo potevano sintetizzare anticorpi contro alcuni semplici antigeni proteici, mentre altri non erano in grado di farlo. Impiegando molti ceppi di topi incrociati tra loro, McDevitt dimostrò che la «responsività» e la «non responsività» erano tratti geneticamente determinati che dipendevano dal particolare tipo di molecole MHC di classe II espresse dai topi in questione.

Analogamente, nel 1974, Rolf Zinkernagel e Peter Doherty della John Curtin School of Medical Research di Canberra scoprirono che i topi di certi ceppi inincrociati morivano in seguito a infezione cerebrale con virus della coriomeningite linfocitaria, mentre altri sopravvivevano. Le vittime producevano in risposta al virus linfociti *T* citotossici che attaccavano il sistema nervoso infettato. (I linfociti *T* hanno di norma un effetto protettivo sull'organismo, ma in questo caso erano coinvolti in una reazione autoimmune mortale.) Come dimostrarono i due studiosi, la capacità di produrre questi linfociti *T* era legata all'espressione di un particolare gruppo di molecole MHC di classe I.

Zinkernagel e Doherty fecero poi un passo avanti fondamentale dimostrando che i linfociti *T* isolati da un topo potevano riconoscere le cellule infettate da virus di un secondo animale; questo accadeva però solo se entrambi gli animali esprimevano le stesse molecole di classe I. In breve, la reazione immunitaria poteva avvenire solo se erano presenti sia il giusto antigene sia la giusta molecola MHC. La necessità della simultanea presenza di un antigene estraneo e di una molecola MHC appropriata fu denominata riconoscimento dell'antigene controllato dall'MHC.

Vari gruppi, in particolare quelli di Alan S. Rosenthal dei National Institutes of Health e di David H. Katz di Harvard, dimostrarono che il riconoscimento dell'antigene controllato dall'MHC poteva spiegare anche le osservazioni

di McDevitt sulla responsività immunitaria. I linfociti *B* non producevano anticorpi contro i semplici antigeni proteici di McDevitt, a meno che non fossero stimolati dai linfociti *T* helper. Questi ultimi riconoscevano solo le cellule presentanti l'antigene che erano state esposte all'antigene proteico e avevano appropriate molecole MHC di classe II.

Nei 10 anni successivi molti gruppi di ricerca tentarono di comprendere come i linfociti *T* riconoscessero sia l'antigene sia le molecole MHC. Studi separati condotti nei laboratori di Emil R. Unanue, prima a Harvard e poi alla Washington University, e di Howard M. Grey del National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine di Denver aprirono la strada a ulteriori, fruttuose scoperte. Essi trovarono che, per stimolare una risposta immunitaria, le proteine extracellulari devono prima essere inglobate per endocitosi e spezzate in peptidi da una cellula presentante l'antigene. I peptidi si legano poi a molecole MHC di classe II che appaiono sulla superficie cellulare come complesso che può essere riconosciuto dai linfociti *T* helper. Questa sequenza di eventi - l'ingestione dell'antigene, la sua frammentazione in peptidi e il legame di questi con le molecole MHC - è chiamata elaborazione dell'antigene.

Anche le molecole MHC di classe I partecipano all'elaborazione dell'antigene. Come è stato scoperto da Alain R. M. Townsend del John Radcliffe Hospital di Oxford, i linfociti *T* citotossici identificano le cellule infettate da virus cercando peptidi virali presentati da una molecola MHC di classe I. Ulteriori ricerche svolte nei laboratori di Thomas J. Braciale della Washington University e Michael J. Bevan dello Scripps Research Institute hanno determinato che tutti i peptidi presentati naturalmente da molecole MHC di classe I derivano da proteine del citoplasma cellulare.

Tutti questi risultati indicano che i due tipi di molecole MHC esaminano antigeni che vengono elaborati in comparti intracellulari diversi. Si è visto in-

variabilmente che i peptidi associati a molecole MHC di classe I derivano dalle proteine della cellula stessa. Le proteine che danno origine ai peptidi associati alle molecole MHC di classe II provengono a volte dal mezzo dove crescono le cellule, ma più spesso da proteine situate sulla membrana esterna.

Un'implicazione importante di queste osservazioni è che gran parte delle molecole MHC che si trovano su una cellula presenta peptidi derivanti da proteine cellulari normali e non da agenti patogeni. Anche quando la cellula ha ingerito un antigene estraneo o è stata infettata, il numero di molecole MHC che presentano peptidi estranei è solo una piccola frazione del totale.

La capacità delle molecole MHC di legarsi a peptidi specifici e di partecipare all'elaborazione degli antigeni è una conseguenza della loro struttura e della loro sintesi. Entrambe le classi di molecole MHC sono composte da due subunità proteiche. Le molecole di classe I consistono di una catena proteica pesante e di una catena leggera molto più piccola, chiamata β_2m . Le due catene delle molecole di classe II sono più o meno delle stesse dimensioni e più piccole della catena pesante della classe I.

Nonostante queste differenze, le analisi cristallografiche a raggi X eseguite

da Don C. Wiley di Harvard e colleghi hanno rivelato che le molecole MHC di classe I e II hanno struttura sorprendentemente simile. Entrambi i tipi presentano un profondo incavo nella superficie superiore, dove si legano i peptidi. La struttura dell'incavo è complessa e contiene diverse tasche che possono interagire con parti diverse del peptide. Le differenze nella forma e nelle proprietà di queste tasche conferiscono ai vari tipi di molecole MHC la loro affinità selettiva per certi peptidi.

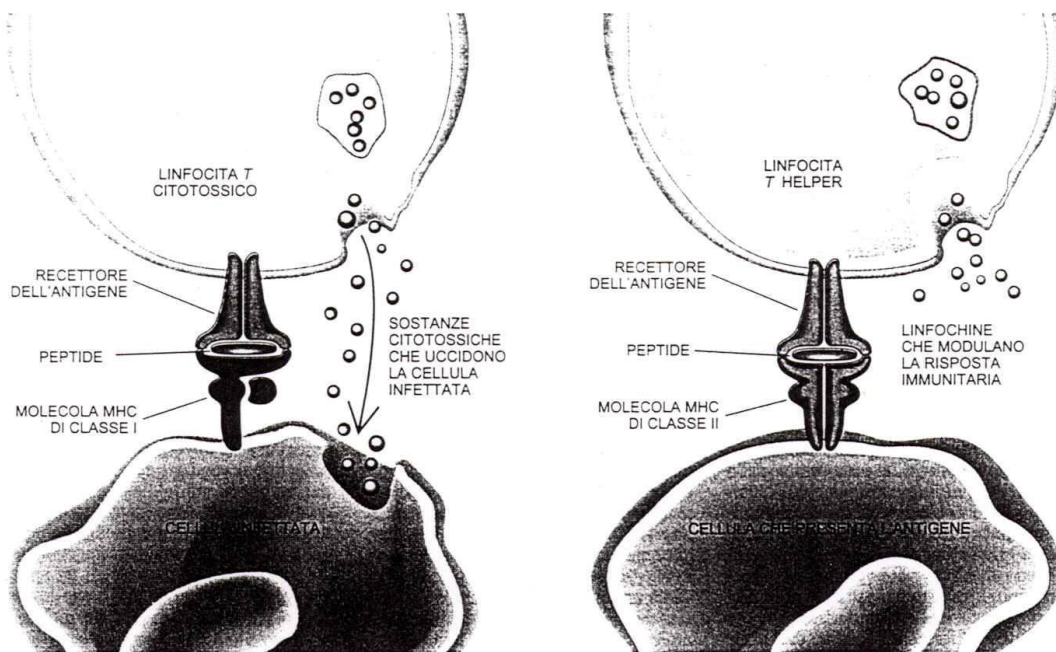
Tuttavia si sta ancora cercando di capire più esattamente che cosa determini queste affinità. Gli studi cristallografici hanno fornito qualche indizio sul legame fra i peptidi e le molecole MHC. Seguendo una via alternativa, si sono cercate anche caratteristiche comuni a tutti i peptidi che si legano a una certa forma di molecola MHC, ma la complessità strutturale dei peptidi rende difficile questo lavoro.

La spettrometria di massa in tandem si è per fortuna rivelata assai utile. Con questa tecnica i peptidi vengono staccati dalle molecole MHC in ambiente acido, purificati e poi fatti passare attraverso uno spettrometro di massa, che può essere utilizzato per determinare le sequenze amminoacidiche costituenti ogni peptide. Robert A. Henderson, Eric L. Hucsko e Ye Chen del mio laborato-

rio e Andrea L. Cox, Hanspeter Michel, Wanda M. Bodnar, Theresa A. Davis e Jeffrey Shabanowitz del laboratorio di Donald F. Hunt presso l'Università della Virginia si sono serviti di questa tecnica per analizzare la struttura di peptidi associati a diverse molecole MHC di classe I dell'uomo. Questi studi hanno confermato che le molecole MHC sono in grado di legarsi a un insieme di peptidi eccezionalmente diversificato. Una cellula umana possiede da mezzo milione a un milione di molecole di classe I di un singolo tipo; stimiamo che in ogni momento queste molecole presentino oltre 10 000 peptidi diversi, e forse addirittura 100 000.

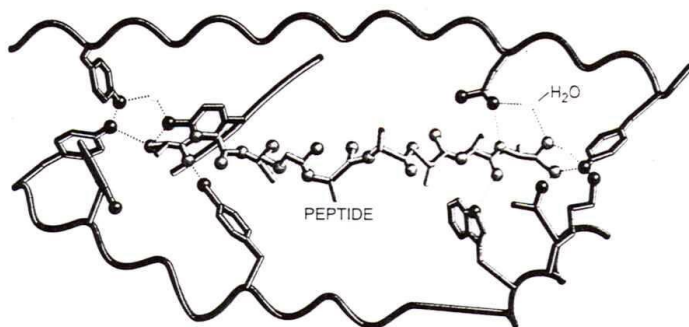
Noi e altri abbiamo scoperto che la maggior parte dei peptidi associati a una particolare forma di molecola di classe I ha in comune alcuni motivi, o caratteristiche, strutturali semplici che permettono il legame. I peptidi che si legano alle molecole MHC di classe I hanno di solito una lunghezza di otto o nove residui amminoacidici. Sembra che questa sia la lunghezza ottimale per consentire alle due estremità del peptide - la terminazione amminica e quella carbossilica - di inserirsi in tasche situate alle estremità opposte dell'incavo di legame della molecola MHC.

Gli amminoacidi in certe posizioni



I complessi antigenici formati da molecole del maggior complesso di istocompatibilità (MHC) e da peptidi possono essere riconosciuti dai linfociti T. Le molecole MHC di classe I, che si trovano su tutte le cellule a corpo nucleato, sono in grado di presentare peptidi virali. I linfociti T reagiscono a questi

complessi uccidendo la cellula infettata (a sinistra). Le molecole MHC di classe II, che si trovano solo sulle cellule specializzate nella presentazione dell'antigene, espongono peptidi ricavati dalla degradazione di proteine extracellulari. Questi complessi provocano la liberazione di linfocchine (a destra).



Le molecole MHC di classe I sono costituite da una subunità pesante e da una subunità $\beta 2m$ più leggera (*in basso*). Nella vista dall'alto un incavo alla sommità della molecola trattiene un peptide, generalmente lungo circa nove residui amminocidici (*al centro*). Le estremità del peptide sono mantenute al loro posto da legami (*linee tratteggiate*) che si formano all'interno di apposite tasche alle estremità dell'incavo (*in alto*).



game della molecola MHC. Queste interazioni forniscono la maggior parte dell'energia di legame. Il resto della catena peptidica si estende al di sopra della superficie dell'incavo e non è fermamente vincolato da interazioni con la molecola MHC, il che implica che quest'ultima può ospitare un'enorme varietà di strutture peptidiche. Molti peptidi derivati da proteine di agenti patogeni hanno motivi strutturali che permettono loro, in appropriate circostanze, di legarsi a una molecola MHC. In effetti, sfruttando queste informazioni si è riusciti in alcuni casi a prevedere quale peptide venga presentato da una molecola MHC su una cellula infettata.

Il sito di legame con il peptide delle molecole MHC di classe II è simile a quello delle molecole di classe I, ma vi sono differenze significative. La più importante è che l'incavo di legame delle molecole di classe II non ha tasche dove si possano inserire specificamente le estremità del peptide. L'interazione di legame ha luogo principalmente nel centro dell'incavo, ossia coinvolge la parte mediana del peptide legato. I peptidi associati a molecole di classe II possono perciò variare di più in lunghezza, e in media sono considerevolmente più lunghi di quelli che si associano a molecole di classe I. Molti peptidi che si legano con una data forma di molecola di classe II costituiscono un gruppo «annidato»: hanno in comune una sequenza centrale di amminocidici (quelli che si legano all'incavo della molecola MHC) e differiscono solo nella lunghezza delle terminazioni amminica e carbossilica.

L'incavo di legame delle molecole di classe II contiene tasche collocate più centralmente rispetto a quelle delle molecole di classe I, ma finora si sa ben poco su come queste strutture pongano vincoli al tipo di amminocidici che il peptide deve avere. Pertanto solo ora si cominciano a definire i motivi strutturali che permetterebbero di prevedere con sicurezza quali peptidi possano legarsi a una molecola MHC di classe II.

L'associazione con i peptidi è un passo normale nella biosintesi e nell'assemblaggio di entrambe le classi di molecole MHC; ma proprio come differiscono le fonti dei peptidi associati a ciascuna classe, così sono diversi anche i meccanismi di assemblaggio.

Dopo la sintesi della catena pesante e della catena leggera $\beta 2m$ che compongono le molecole di classe I, le due subunità si uniscono all'interno di un organello membranoso, il reticolo endoplasmatico. Se $\beta 2m$ non è presente, la catena pesante non può avvolgersi nella conformazione esatta. Non può allora attraversare un altro organello, l'apparato di Golgi, ed essere avviata alla sua destinazione finale sulla superficie cellulare. Come hanno rivelato ricerche recenti, il complesso catena pesante- $\beta 2m$, per completare il suo viaggio, deve anche legarsi a un peptide mentre si trova nel reticolo endoplasmatico.

Townsend e Klaus Kärre del Karolinska Institut di Stoccolma hanno dimostrato questo fatto con grande eleganza. Essi hanno identificato cellule mutanti che portavano in superficie solo il 5 per cento del numero standard di molecole MHC di classe I, anche se sintetizzavano quantità normali di catene pesanti e di catene leggere $\beta 2m$. Le catene però non erano avvolte e rimanevano intrappolate nel reticolo endoplasmatico. Quando Townsend e Kärre aggiunsero i peptidi appropriati a queste cellule, le catene si avvolsero correttamente, e le cellule riuscirono a esprimere livelli quasi normali di molecole di classe I. Così, i peptidi stabilizzano le interazioni delle catene pesanti e leggere, agendo per molti versi come una terza subunità della molecola di classe I.

L'identificazione di cellule mutanti, come quelle studiate da Townsend e Kärre, in cui i peptidi non riescono ad associarsi a molecole MHC di classe I ha spinto diversi gruppi di ricerca a indagare il difetto. Alla fine del 1990 quattro gruppi hanno identificato simultaneamente due geni dell'MHC che codificano per proteine di trasporto. Queste proteine sono membri di un'ampia famiglia di molecole simili che favoriscono il trasporto di piccole molecole attraverso la membrana cellulare di vari organismi. Gli scopritori hanno ipotizzato che le nuove proteine associate all'MHC trasportino peptidi dal citoplasma al reticolo endoplasmatico e le hanno battezzate TAP (trasportatori associati all'elaborazione degli antigeni).

dei peptidi sono anche altamente conservati; per esempio, la maggior parte dei peptidi che si lega alla molecola MHC di classe I umana HLA-A2.1 ha un residuo di leucina nella seconda posizione a partire dalla terminazione amminica; all'estremità carbossilica della molecola l'ultimo amminocidico è sempre idrofobo e privo di carica. Al contrario, i peptidi che si legano alla molecola MHC di classe I umana HLA-B27 hanno un residuo di arginina in seconda posizione e terminano con un residuo carico positivamente e idrofilo.

Queste informazioni e altri dati strutturali hanno composto un quadro molto semplice di come i peptidi si leghino alle molecole MHC di classe I. Le due estremità del peptide e due o tre ulteriori residui amminocidici si inseriscono in tasche ben separate nell'incavo di le-

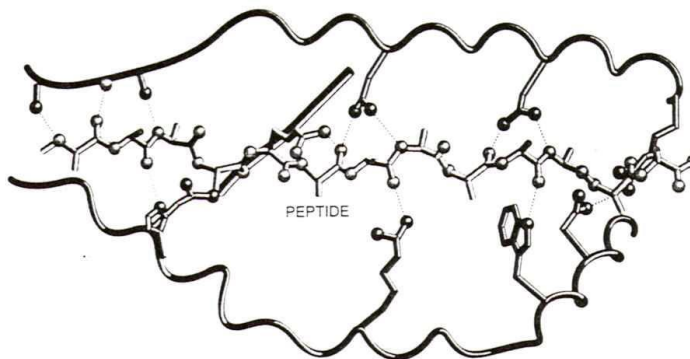
Studi successivi hanno rivelato che tutte le linee note di cellule mutanti che presentano questo tipo di elaborazione imperfetta degli antigeni hanno difetti nell'uno o nell'altro dei geni TAP. Numerosi esperimenti hanno dato conferma a questa ipotesi, compresa una dimostrazione diretta del fatto che vescicole di membrana contenenti TAP catalizzano il trasporto di piccoli peptidi.

Come vengono prodotti i peptidi trasportati dalle TAP? Non si ha ancora una risposta definitiva, ma è estremamente probabile che sia coinvolto un complesso enzimatico chiamato proteasoma. I proteasomi sono grandi strutture cilindriche che si trovano in molti compartimenti della cellula. Sono un insieme di molte differenti proteasi (enzimi che tagliano le proteine) e sembrano essere il principale meccanismo cellulare per degradare proteine che hanno cessato di essere utili, sono state danneggiate o si sono avvolte in modo non corretto.

John J. Monaco del Medical College of Virginia ha eseguito alcuni degli studi più interessanti sui proteasomi dimostrando che due subunità che talvolta si trovano su di essi sono specificate da geni dell'MHC che si trovano immediatamente adiacenti a quelli per le TAP. Di norma, solo il 10 per cento circa dei proteasomi di una cellula contiene queste subunità, ma se la cellula è esposta all'interferone gamma (una linfocina liberata durante la risposta immunitaria) l'espressione di queste subunità aumenta ed esse appaiono associate a un numero maggiore di proteasomi. (Anche l'espressione di molecole MHC e di TAP da parte della cellula aumenta.)

Kenneth L. Rock e Alfred L. Goldberg di Harvard hanno di recente dimostrato che l'inclusione di queste subunità in un proteasoma fa sì che esso produca peptidi che terminano con amminoacidi basici o idrofobi, ossia proprio del tipo a cui si lega gran parte delle molecole di classe I. Non si sa se le due subunità alterino anche la lunghezza dei peptidi prodotti in modo che si conformi a quella ottimale per le molecole di classe I. Tuttavia vi sono buone ragioni per ritenere che le proteine prodotte nel citoplasma siano degradate dai proteasomi e trasportate dalle TAP nel reticolo endoplasmatico, dove possono legarsi alle molecole MHC di classe I.

Una osservazione strana, però, è che molte cellule mutanti prive di una o di entrambe le componenti delle TAP esprimono ugualmente alla loro superficie livelli abbastanza elevati di qualche forma di molecole MHC di classe I. Henderson e Michel hanno cercato entrambi di scoprire come questo avvenga e hanno trovato che su queste cellule i peptidi associati alle molecole di classe I sembrano provenire tutti dalle sequenze segnale delle proteine cellulari. Le sequenze segnale sono strutture che si trovano comunemente alla terminazione amminica di proteine appena sin-



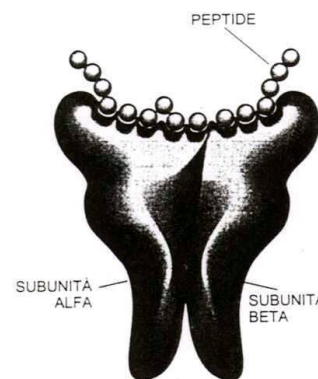
Le molecole MHC di classe II hanno subunità alfa e beta quasi uguali per dimensioni (*in basso*). Anche queste molecole trattengono i peptidi in un incavo (*al centro*), ma in questo caso i peptidi sono fissati soprattutto da legami che si formano al centro dell'incavo (*in alto*). I peptidi legati alle molecole di classe II sono quindi in genere più lunghi, e di lunghezza più variabile, rispetto a quelli associati alle molecole di classe I.



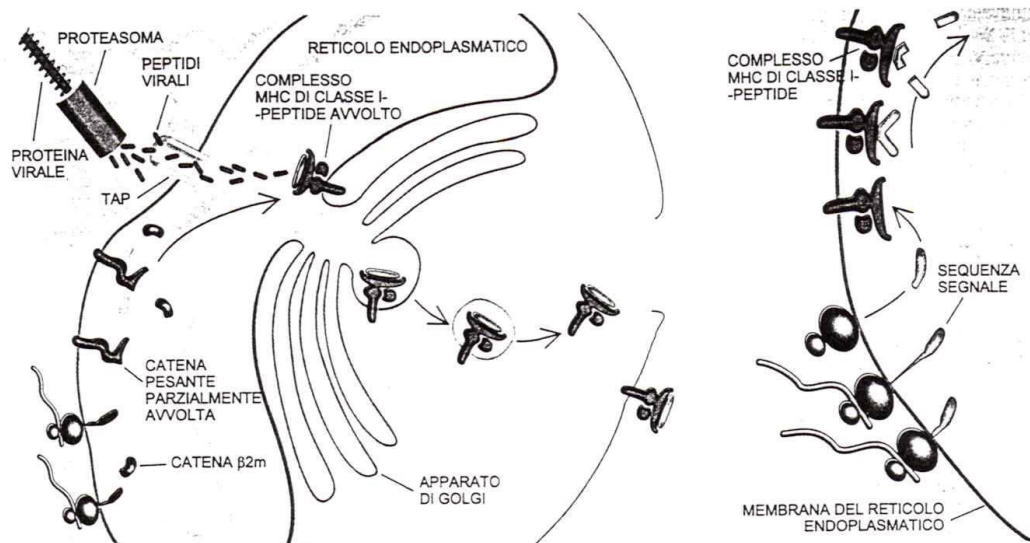
tetizzate che si stanno dirigendo verso la superficie cellulare o un comparto interno della cellula. Quando i ribosomi sintetizzano queste proteine, le sequenze segnale fanno sì che essi si fissino al reticolo endoplasmatico prima che la proteina sia completata. In effetti queste sequenze aiutano a dirigere le nuove proteine lungo il cammino verso la loro destinazione.

Quando la proteina si trasferisce nel reticolo endoplasmatico, un enzima taglia la sequenza segnale dalla sua estremità anteriore. Una volta liberate, le sequenze segnale nel reticolo endoplasmatico costituiscono una ricca fonte di peptidi che possono associarsi alle molecole MHC di classe I, compensando così la difettosa elaborazione degli antigeni da parte della cellula mutante. Si è scoperto che almeno due peptidi riconosciuti dai linfociti T derivano da sequenze segnale, il che indica che questa via alternativa di elaborazione degli antigeni può avere grande importanza.

Considerando che le molecole MHC di entrambe le classi si assemblano nel reticolo endoplasmatico, è sorprendente che non si leghino agli stessi peptidi. La spiegazione può essere, in parte, trovata nel fatto che i peptidi trasportati nel reticolo endoplasmatico dalle TAP non hanno caratteristiche strutturali che consentano un legame stabile con le molecole MHC di classe II. Una spiegazione più convincente può essere però questa: immediatamente dopo la loro sintesi le subunità di classe II si associano a una terza molecola, chiamata catena invariante o Ii. La catena invariante impedisce ai peptidi di legarsi al-



le molecole di classe II, o interferendo direttamente col legame o mantenendo le molecole stesse in uno stato non del tutto avvolto. Essa avvia anche le molecole MHC di classe II verso la superficie cellulare lungo un percorso che le molecole di classe I e la maggior parte delle altre proteine di membrana non seguono, facendole passare nell'apparato di Golgi e negli endosomi. Questi ultimi sono vescicole formate da invaginazioni della membrana cellulare e contengono spesso proteine di superficie e i leganti loro associati. Quando gli endosomi entrano nella cellula, il loro interno diviene acido, ed essi accumulano proteasi che degradano molte delle proteine di superficie inglobate e dei loro leganti. Infine gli endosomi tornano alla membrana, si fondono con essa e restituiscono il contenuto alla superficie.



La via di interazione con gli antigeni delle molecole di classe I (a sinistra) comincia quando proteine intracellulari, come quelle di un virus, vengono ridotte a peptidi dai proteasomi. I peptidi sono poi avviati da una proteina trasportatrice, la TAP, nel reticolo endoplasmatico, dove si associano alle subunità parzialmente avvolte delle molecole di classe I in un com-

plesso MHC-peptide avvolto. Il complesso attraversa l'apparato di Golgi ed è trasportato alla superficie cellulare. In una variante di questa via scoperta dall'autore e dai suoi colleghi (a destra), i peptidi possono formarsi dalle sequenze segnale che vengono tagliate dall'estremità iniziale di proteine cellulari in fase di assemblaggio nel reticolo endoplasmatico.

Peter Cresswell della Duke University ha scoperto che, quando i complessi formati da molecole di classe II-peptide entrano negli endosomi, il movimento delle vescicole verso la superficie si blocca anche per sei ore. Durante questo intervallo, le proteasi endosomiali digeriscono la catena invariante, il che consente alle molecole di classe II di legarsi ad altri peptidi della vescicola, molti dei quali derivano naturalmente da fonti extracellulari. Infine i complessi molecola di classe II-peptide raggiungono la superficie cellulare.

Un altro aspetto interessante della formazione dei complessi molecola di classe II-peptide è stato scoperto osservando cellule mutanti create da Elizabeth D. Mullins e Donald A. Pious dell'Università di Washington. Le molecole di classe II alla superficie di queste cellule hanno una forma stranamente floscia e facilmente denaturabile; per aspetto e comportamento, esse assomigliano alle molecole di classe II appena sintetizzate nel reticolo endoplasmatico. Si potrebbe allora supporre che queste molecole di superficie flosce siano prive anch'esse di un peptide stabilizzante, ma il loro isolamento diretto da cellule mutanti ha dimostrato che non è così: le molecole flosce sono legate a un gruppo di peptidi che derivano da una piccola regione della catena invariante e sono chiamati CLIP (da *class II-associated invariant chain peptides*, ossia peptidi della catena invariante associati a molecole di classe II).

La mutazione di queste cellule sembra interferire con la capacità delle molecole MHC di classe II di legarsi a qualsiasi peptide tranne che a quelli della catena invariante. In esperimenti indipendenti, la Mullins e Pious hanno dimostrato di recente che il difetto in queste cellule interessa una molecola da poco identificata, chiamata DM, che è strutturalmente correlata alle molecole di classe II convenzionali, ma distinta da esse. Prima del loro lavoro, la funzione della DM era del tutto ignota.

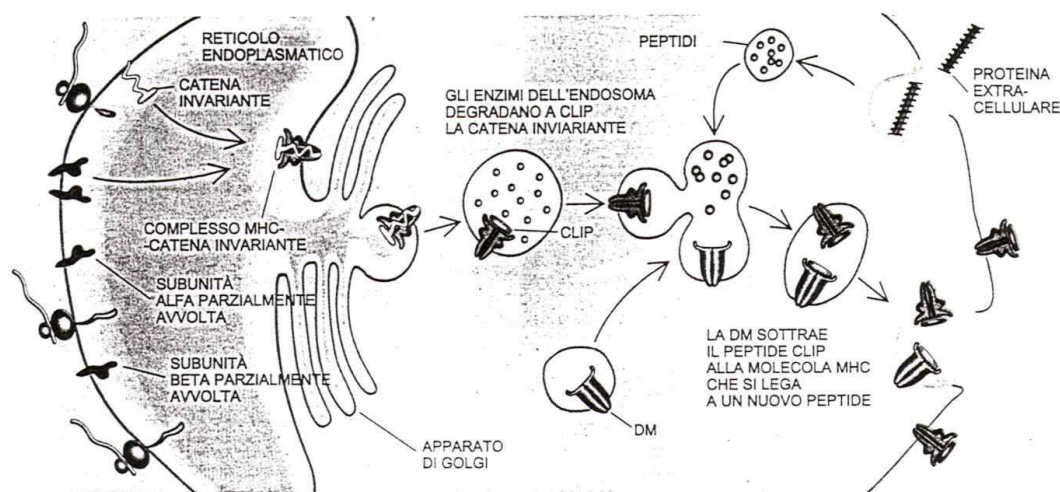
Il ruolo esatto dei CLIP e della DM nella normale via di elaborazione delle molecole di classe II non è ancora noto. Un'ipotesi attraente è che un CLIP sia la parte della catena invariante che occupa fisicamente l'incavo di legame con il peptide della molecola di classe II, o almeno che alteri la struttura della molecola di classe II in modo da impedire il legame di altri peptidi. Dopo che la catena invariante è stata degradata nell'endosoma, CLIP resta ancora associato alla molecola di classe II fino a che viene attivamente rimosso dalla DM.

Come abbiamo visto, i meccanismi di elaborazione degli antigeni creano un campione rappresentativo di peptidi a partire dalla miriade di proteine che una cellula produce o ingerisce. La presentazione di questi peptidi sulle molecole MHC permette a sua volta al sistema immunitario di identificare e distruggere le cellule che ospitano agenti infettivi o che sono comunque anormali.

Le molecole MHC devono essere in grado di presentare molti peptidi estranei, e di farlo in maniera tale che il complesso appaia differente da uno formato con un peptide simile. Questa necessità spiega probabilmente perché il singolo individuo esprima diverse forme di molecole MHC di classe I e II e perché una popolazione contenga centinaia di forme. Alcune di esse hanno maggiori probabilità di altre di legarsi a peptidi di agenti patogeni specifici.

Esempi concreti del significato della varietà MHC cominciano ad apparire in letteratura. Alcuni anni fa Adrian Hill di Oxford e colleghi raccolsero dati secondo cui nell'uomo la suscettibilità alla malaria varia con l'espressione di certe molecole MHC di classe I. Le forme che sembrano conferire la massima resistenza sono particolarmente comuni in popolazioni che vivono dove la malaria è diffusa, un effetto chiaramente dovuto alla selezione naturale.

Come ci si può aspettare, tuttavia, alcuni agenti patogeni hanno imparato a combattere il sistema di elaborazione degli antigeni che tante volte li ha sconfitti. Alcuni virus, per esempio, possono sopprimere l'espressione delle molecole MHC durante i primi stadi di un'infezione. Molti tipi di adenovirus producono una molecola che si lega alle molecole MHC di classe I appena sintetizzate nel reticolo endoplasmatico e impedisce la loro espressione alla superficie cellulare. Altri adenovirus sintetizzano



La via di interazione con gli antigeni delle molecole di classe II comincia dal legame delle subunità della molecola MHC con la catena invariante. Dopo che questo complesso è passato attraverso l'apparato di Golgi, la catena invariante viene ridotta a un peptide più piccolo, chiamato CLIP. Si pensa che

all'interno delle vescicole endosomiche una molecola chiamata DM sottragga CLIP al complesso MHC, liberando la molecola MHC e permettendole di legarsi con peptidi derivati da proteine extracellulari. Questo complesso finale peptide-molecola di classe II si porta allora sulla superficie cellulare.

una molecola che interferisce con l'espressione del gene per le molecole di classe I. Un'interferenza con l'espressione alla superficie cellulare delle molecole MHC di classe I è stata di recente descritta anche per il citomegalovirus e il virus dell'herpes simplex, sebbene i loro meccanismi d'azione non siano noti. Nonostante questi esempi, l'elaborazione degli antigeni in generale permette al sistema immunitario di controllare bene le infezioni.

Questo processo potrebbe essere importante anche nel controllo del cancro. Dato che molti tumori esprimono proteine mutate, il sistema immunitario potrebbe cercare peptidi derivati da queste proteine come indicatori del fatto che la cellula si è trasformata e sta per dare origine a un tumore. Sono stati identificati molti tumori nei quali l'espressione delle molecole MHC di classe I è ridotta. Manipolazioni sperimentali che incrementano l'espressione di molecole MHC spesso rendono questi tumori più controllabili da parte del sistema immunitario. Dati recenti indicano anche che alcuni tipi di cellule neoplastiche possono ridurre la propria espressione delle TAP, presumibilmente per evitare il riconoscimento da parte dei linfociti T.

La natura dei peptidi che i linfociti T specifici per le cellule neoplastiche possono riconoscere è in corso di studio. Thierry Boon e colleghi del Ludwig Institute for Cancer Research di Bruxelles hanno esaminato in dettaglio i linfociti T che riconoscono cellule di melanoma umano (si veda l'articolo *Come combattere il cancro attivando il sistema immunitario* di Thierry Boon in «Le Scienze» n. 297, maggio 1993). Essi

hanno dimostrato che un bersaglio dei linfociti T sembra essere un gruppo di peptidi derivati da una proteina chiamata MAGE-1, che è espressa in molti tumori, ma è quasi irrilevante nei tessuti normali. Boon, Steven A. Rosenberg del National Cancer Institute e i miei colleghi e io dell'Università della Virginia abbiamo anche identificato peptidi antigenici derivanti da tre proteine che vengono espresse sia da melanociti normali sia da cellule di melanoma.

Questi risultati indicano che l'efficacia dell'immunità antitumorale potrebbe essere in parte limitata dalla disponibilità di peptidi bersaglio insoliti nelle cellule neoplastiche. I tentativi di potenziare l'immunità antitumorale dovranno certamente comportare l'identificazione sulle cellule neoplastiche di complessi molecola MHC di classe I-peptide che i linfociti T possono riconoscere, oltre alla messa a punto di strategie per accrescerne l'immunogenicità.

Per crudele ironia, sembrano esservi dei casi in cui il sistema di elaborazione degli antigeni funziona in senso contrario a quello di mantenere in buona salute l'organismo. Nell'ultimo decennio si è fatta l'interessante scoperta che l'espressione di certe molecole MHC di classe II è correlata a molte malattie autoimmuni, come il diabete giovanile e l'artrite reumatoide, nelle quali il sistema immunitario attacca, con esiti disastrosi, i tessuti dell'ospite. Queste molecole MHC presentano probabilmente peptidi dell'ospite e così facendo inducono l'attacco immunitario. Il sistema immunitario possiede meccanismi che normalmente impediscono questo tipo di presentazione o bloccano le risposte

distruttive; perché in certi casi questi meccanismi non funzionino è ancora un mistero.

In che modo la presentazione di peptidi derivati dall'organismo e da fonti estranee sia collegata allo sviluppo di queste patologie è uno dei problemi più impegnativi che oggi gli immunologi devono affrontare. Via via che il quadro si chiarirà, si potranno progettare terapie che permettano di manipolare selettivamente l'elaborazione degli antigeni. Un giorno potremo essere in grado di bloccare la presentazione di antigeni che scatenano una malattia autoimmune o di potenziare l'elaborazione di antigeni che rivelano la presenza di infezioni o tumori. Per ora, tuttavia, i misteri ancora irrisolti sono più che sufficienti a tenere impegnati gli immunologi.

BIBLIOGRAFIA

- GERMAIN RONALD N. e MARGULIES DAVID H., *The Biochemistry and Cell Biology of Antigen Processing and Presentation* in «Annual Review of Immunology», 11, pp. 403-450, 1993.
- SETTE ALESSANDRO (a cura), *Naturally Processed Peptides*, Karger, 1993.
- STERN LAWRENCE J. e WILEY DON C., *Antigenic Peptide Binding by Class I and Class II Histocompatibility Proteins* in «Structure», 2, n. 4, 15 aprile 1994.
- ENGELHARD VICTOR H., *Structure of Peptides Associated with Class I and Class II MHC Molecules* in «Annual Review of Immunology», 12, pp. 181-207, 1994.