

## ARTICOLI ORIGINALI

## Immunogenetica delle nefropatie

**Antonio Amoroso**

Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, ed SC Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

Corrispondenza a: Antonio Amoroso; Via Santena, 19 - 10126 Torino - Italy; Tel:+39 011 6334441 / +39 011 6336760 Cel:+39 335 1328227 Fax:+39 011 6336529 Mail: antonio.amoroso@unito.it

**Abstract**

Sono numerose le evidenze che i geni HLA siano fattori di rischio per malattie renali complesse alla cui patogenesi concorre una risposta anomala del sistema immunitario.

In questa review si presentano le conoscenze più aggiornate circa la genetica del complesso HLA, le molecole codificate dai geni HLA, il loro polimorfismo ed il ruolo fisiologico del sistema HLA nella difesa contro le infezioni. Si affronta poi il tema dell'associazione tra specifiche varianti alleliche dell'HLA e le patologie renali. Sono molteplici le malattie renali che sono state descritte associate con HLA. Questa review si concentra su alcuni esempi di nefropatie, esplorando in maggior dettaglio in che modo alcuni antigeni HLA costituiscono un fattore di rischio per la glomerulonefrite membranosa idiopatica, la malattia di Goodpasture e le vasculiti associate alla presenza di ANCA. Queste malattie offrono infatti un buon esempio di come la presenza di alcune varianti dei geni HLA di classe II favoriscano negli individui che li possiedono la presentazione di peptidi derivati da alcune proteine self, in grado di avviare la risposta autoimmunitaria. Lo studio immunogenetico di molte malattie complesse renali può essere utile per la comprensione della loro patogenesi ed il possibile sviluppo di nuove terapie.

**Parole chiave:** genetica, glomerulonefriti, HLA, immunogenetica, malattie complesse, suscettibilità

**Immunogenetics of glomerulopathies**

*There are many evidences that the HLA genes are risk factors for kidney complex disease for the pathogenesis of which an abnormal response of the immune system is involved.*

*In this review, we present the latest knowledge about the genetics of the HLA complex, the molecules encoded by the HLA genes, their polymorphism and the physiological role of the HLA system in the defense against infections. It then addresses the issue of the association between specific alleles of HLA and renal disorders. Many kidney diseases have been described associated with HLA. This review focuses on some examples of renal diseases, exploring in detail how certain HLA antigens are a risk factor for idiopathic membranous glomerulonephritis, Goodpasture's disease and vasculitis associated with the presence of ANCA. These diseases indeed offer a good example of how the presence of some variants of HLA class II genes in individuals who possess them promote the presentation of peptides derived from certain self proteins, able to initiate the autoimmune response. Immunogenetic study of many complex renal diseases can be useful for the understanding of their pathogenesis and the possible development of new therapies.*

**Key words:** complex diseases, genetics, glomerulonephritis, HLA, immunogenetics, susceptibility

**Immunogenetica**

Lo studio del genoma umano ha permesso di catalogare tutti i geni (circa ventiduemila) e la loro variabilità tra gli individui: alcuni milioni di punti di variabilità nella lunga stringa della sequenza di circa 3 miliardi di nucleotidi che compongono il nostro genoma.

Sappiamo che esistono migliaia di geni che codificano per proteine che sono rilevanti per il funzionamento del nostro sistema immunitario. Sappiamo, ad esempio, che - quando mutati - alcuni geni sono responsabili di malattie monogeniche caratterizzate da immunodeficienza: si conoscono oggi più un centinaio di immunodeficienze su base monogenica. Inoltre, conosciamo che la variabilità individuale dell'assetto immunologico e della risposta immunitaria è in parte dovuta al background genetico di ciascun soggetto. Il set di geni coinvolti nel funzionamento della risposta immunitaria definisce l'oggetto della disciplina *immunogenetica*. Alcuni sono particolarmente rilevanti e si trovano in una regione particolare del genoma: il complesso maggiore

d'istocompatibilità (o MHC) che nell'uomo è definito "HLA".

**HLA****2.1 Definizione**

Le molecole HLA sono glicoproteine di membrana - codificate da altrettanti geni - presenti su una grande varietà di cellule nucleate il cui ruolo è quello di presentare gli antigeni peptidici ai linfociti T, i quali, quindi, riescono a discriminare se l'antigene appartiene all'organismo (self) o meno (non self). In quest'ultimo caso attivano una risposta immune finalizzata alla sua eradicazione. Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC - Major Histocompatibility Complex) è la regione di geni altamente polimorfici, che codificano per alcune molecole coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria, tra cui le molecole HLA.

**2.2 Scoperta e nomenclatura**

Le molecole HLA (Human Leucocyte Antigens) devono il loro nome al fatto che furono scoperte

nell'ambito di studi riguardanti il rigetto dei trapianti quali bersagli di anticorpi presenti nelle reazioni di rigetto nel topo o bersagli di anticorpi anti-leucocitari in pazienti politrasfusi e in donne pluripare. Già negli anni '30, infatti, era stata dimostrata l'esistenza di antigeni di istocompatibilità con l'individuazione del sistema H-2 del topo. Agli inizi degli anni '60 [1] [2] si osservò, anche nell'uomo, la presenza di antigeni leucocitari in grado di indurre una forte risposta allo-immune: questi antigeni furono pertanto definiti HLA e il locus genetico (vale a dire il luogo dove erano posizionati i geni che codificavano queste proteine) responsabile della loro produzione fu chiamato MHC (Major Histocompatibility Complex). Il rigetto di un trapianto, tuttavia, non è un fenomeno biologico naturale e quindi i geni MHC e le molecole da essi codificate non si sono certo evoluti per mediare tale fenomeno. Oggi sono conosciute la funzione fisiologica delle molecole MHC, la più importante delle quali è quella di presentare i peptidi derivati da antigeni proteici ai linfociti T specifici.

### 2.3 Struttura dell'MHC

L'MHC umano (che come detto si identifica nel sistema HLA) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (banda 6p21.3, a circa 6000 kb dal centromero). Fino al 1999 si sapeva che l'MHC comprendeva una regione lunga circa 4 Mb, circa lo 0.1% del genoma nucleare, per un totale di circa 224 geni. La conoscenza di una nuova estensione dell'MHC, detta xMHC (extended MHC in human) è stata completata nel 2003 grazie al progetto di sequenziamento dell'intero genoma umano, cosicché l'intera regione oggi si estende per un totale di 7,6 Mb [3]. L'insieme di questi geni è stato suddiviso in regioni o classi: classe I (la più telomerica); classe II (la più centromerica); classe III (quella intermedia) [4] [5] [6] [7]. Oggi sono pure conosciute una regione estesa di classe II ed una di classe I [3].

Le molecole di classe I, codificate dai geni HLA-A, B e C, e le molecole di classe II, codificate dai geni HLA-DP, da quelli -DQ e da quelli -DR, sono presenti sulla membrana esterna di una grande varietà di cellule nucleate e rappresentano gli antigeni di istocompatibilità. Essi sono coinvolti nella presentazione dei peptidi antigenici ai linfociti T [8] [9], non essendo in grado, questi ultimi, di riconoscere antigeni solubili al contrario dei linfociti B. All'interno della regione di classe I sono stati descritti altri geni chiamati HLA-E, -F e -G (o geni non classici di classe I) e numerosi altri pseudogeni non codificanti [10]. Anche all'interno della regione di classe II, oltre alle tre principali sub-regioni HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, che contengono ciascuna un differente numero di geni, sono stati identificati numerosi altri geni e pseudogeni. Vi sono infatti geni HLA di classe II non classici (DM e DN), o geni che codificano per componenti del proteosoma (LMP) o del sistema di trasporto dei peptidi dal citosol al reticolo endoplasmico (ER), come TAP. I geni HLA di classe III, infine, sono responsabili della produzione di molecole solubili, quali fattori del com-

plemento, enzimi microsomiali, citochine e proteine dello shock termico.

### 2.4 Struttura proteica delle molecole HLA

Le strutture delle molecole HLA di classe I e di classe II sono simili, per la conformazione che possiedono. Si nota infatti come esse vengano montate sulla membrana, siano costituite da 2 catene che si assemblano assieme (eterodimeri) e come la parte più esterna della molecola si conformi in maniera tale da determinare una sorta di tasca (o solco) nel quale trovano alloggiamento dei piccoli frammenti di proteine, o peptidi. Esistono però delle differenze, che vengono prese in esame nei due paragrafi che seguono.

#### 2.4.1. Struttura proteica HLA di classe I

I geni HLA di classe I più conosciuti sono quelli che codificano per gli antigeni glicoproteici di superficie HLA-A, HLA-B e HLA-C; oltre a questi sono note altre molecole HLA, cosiddette non classiche, denominate HLA-E, HLA-F, HLA-G espresse su diversi tessuti, ed alcuni geni che non vengono espressi, come HLA-H, HLA-J e HLA-L. Le molecole di classe I sono composte da una catena glicoproteica polimorfica pesante  $\alpha$  con un peso molecolare di circa 44 kDa, associata in modo non covalente ad una catena glicoproteica monomorfica leggera, codificata al di fuori del locus MHC, nel braccio lungo del cromosoma 15 e precisamente nella regione 15q 21.1-22.2, con peso molecolare di circa 12 kDa e denominata  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m). Nel dettaglio la **catena  $\alpha$**  è composta da 342 aminoacidi suddivisi in tre porzioni o regioni: una regione extracellulare idrofila esposta sulla membrana cellulare e composta dai primi 274 residui aminoacidici a partire dall'estremo N-terminale; una regione idrofobica transmembrana composta dai residui aminoacidici 275-314; una regione idrofila intracitoplasmatica composta dai residui aminoacidici 315-342). **La regione extracellulare** è a sua volta strutturata in tre domini denominati  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3 codificati rispettivamente dal secondo, dal terzo e dal quarto esone; i domini  $\alpha$ 2e  $\alpha$ 3 sono caratterizzati ognuno da un legame disolfuro (S-S) che dà luogo ad una conformazione ad anello. I domini  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 portano le specificità antigeniche allelomorfiche A, B e C riconosciute dagli alloantisieri e delimitano una cavità o tasca in cui sono montati e presentati i peptidi antigenici (sequenze di pochi aminoacidi) al recettore TCR dei linfociti T. Il dominio  $\alpha$ 3 al contrario non è polimorfico ed è responsabile del legame con il co-recettore CD8 e per tale ragione le molecole di classe I possono attivare solo i linfociti CD8+. È di notevole interesse la struttura della tasca di legame del peptide: ad oggi è nota la struttura in 3D delle molecole di classe I e II, ottenuta con metodi cristallografici. Poiché queste molecole sono stabili solo se legano il peptide, le strutture in 3D ottenute sono quelle di molecole HLA associate ai peptidi da esse presentate. Questo ha permesso di analizzare nel dettaglio anche l'interazione HLA-peptide, e le caratteristiche dei peptidi legati da una certa molecola HLA. La base della tasca è formata da un foglietto  $\beta$  anti-

parallelo di 8  $\beta$ -strands. Sopra di esso sono poste due  $\alpha$  eliche che, formando le pareti della tasca, si avvicinano molto alle due estremità, chiudendo così la tasca stessa: a causa di ciò, la molecola HLA di classe I lega solo peptidi di lunghezza molto precisa, circa 7-8 aminoacidi. L'analisi di diversi peptidi legati dalla stessa molecola HLA ha evidenziato come si debbano avere alcuni elementi costanti che permettono una interazione con gli aminoacidi che formano la tasca della molecola HLA. Nel caso dell'HLA di classe I, di solito, si ha interazione tra i due aminoacidi N e C terminale (che presentano i gruppi  $\text{NH}_3^+$  e  $\text{COOH}^-$ ) ed aminoacidi di carica opposta presenti nella tasca. Altri residui all'interno del peptide (detti residui di ancoraggio) permettono il legame con la tasca, tramite interazioni di vario tipo. In genere i peptidi presentano pochi residui con caratteristiche comuni in certe posizioni (aminoacidi che garantiscono l'interazione), mentre il resto della sequenza è notevolmente variabile. La variabilità dell'HLA invece è necessaria per far sì che sia possibile stabilire un'interazione con il peptide: una delle diverse forme di HLA espresse da un individuo (come risultato dei fenomeni di polimorfismo e poligenismo) sarà sicuramente capace di interagire con un certo peptide. La regione intracitoplasmatica, codificata dagli esoni 6, 7 e 8, svolge la funzione di ancorare la catena pesante alla cellula e possiede la capacità di essere soggetta a fosforilazione: potrebbe quindi essere deputata a trasdurre segnali esterni della molecola di classe I all'interno della cellula. La  $\beta$ 2-microglobulina ha funzione di sostegno e stabilizzazione della catena pesante, la quale, in sua assenza, non potrebbe essere espressa dalla cellula. Essa è composta da 92 aminoacidi, con il radicale amino-terminale rivolto all'esterno verso il radicale amino-terminale del dominio  $\alpha$ 1, al quale è legato, ed il radicale carbossi-terminale rivolto verso la membrana cellulare. Essendo monomorfa è uguale in tutti i soggetti della stessa specie e, avendo una buona omologia con la regione costante delle immunoglobuline (caratteristica presente anche nel dominio  $\alpha$ 3), si ritiene appartenga alla superfamiglia delle Ig; è legata non covalentemente al dominio  $\alpha$ 1 della catena pesante ed un ponte disolfuro intracatena crea una conformazione ad anello. Gli antigeni che mostrano il più elevato polimorfismo sono gli antigeni HLA-B, seguiti dalle molecole codificate dai loci HLA-A ed HLA-C. Il ruolo di queste molecole di classe I è quello di presentare peptidi antigenici sulla superficie cellulare ai linfociti T CD8<sup>+</sup>. Le molecole HLA di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate, e quindi non sono presenti sui globuli rossi [4] [5] [6] [10].

#### 2.4.2. Struttura proteica HLA di classe II

Gli antigeni glicopeptidici proteici codificati dai geni di classe II sono HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP e la loro distribuzione tissutale è, in condizioni basali, limitata alle cellule che hanno la funzione di presentare l'antigene (Antigen Presenting Cells o APC) quali linfociti B, cellule dendritiche, macrofagi, cellule endoteliali e linfociti T attivati. La presenza di questi antigeni su cellule che costituzionalmente non li

esprimono è stimolata dalle citochine. Le molecole di classe II sono eterodimeri costituiti da una catena glicoproteica pesante denominata catena  $\alpha$  (di circa 34 kDa) ed una catena glicoproteica leggera denominata catena  $\beta$  (di circa 29 kDa) associate tra loro da legami non covalenti. A differenza delle molecole di classe I entrambe le catene sono codificate dai geni HLA e sono costituite rispettivamente, nel caso degli antigeni HLA-DR, da polipeptidi di 229 e 237 aminoacidi organizzati in quattro domini. Entrambe le catene sono suddivise in tre regioni: una **regione extracellulare** idrofila, composta da due domini detti rispettivamente  $\alpha$ 1 (l'unico dominio non provvisto di ponte disolfuro intracatena),  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2; una regione idrofobica **transmembrana** con struttura ad alfa-elica; ed una regione **intracellulare** idrofila. Gli antigeni HLA di classe II presentano i peptidi di derivazione generalmente extracellulare ai linfociti T CD4<sup>+</sup>. La tasca di legame del peptide ha una struttura abbastanza simile a quella della classe I ma in questo caso, però, le due  $\alpha$  eliche si mantengono distanti anche alle estremità della tasca lasciandola 'aperta': la tasca della molecola HLA di classe II, per tale ragione, lega peptidi di lunghezza più variabile rispetto alla classe I e compresa tra i 13 e i 20 aminoacidi.

Il polimorfismo risiede nei domini  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1 (più accentuato in quest'ultimo) ed è elevatissimo in quanto il ruolo delle molecole codificate dai geni HLA di classe II è quello di presentare peptidi dalle origini più diverse [4] [5] [6] [10]. Il dominio non polimorfico  $\beta$ 2 rappresenta il punto di contatto per il co-recettore CD4 e per tale ragione le molecole di classe II possono attivare solo le cellule CD4<sup>+</sup>.

#### 2.5. La struttura dei geni HLA

La struttura dei singoli geni che codificano per le molecole HLA è in linea generale simile per quelli di classe I e per quelli di classe II. Essi si trovano nella regione MHC e sono costituiti da una successione di introni e di esoni: i primi, sequenze nucleotidiche di regolazione non tradotte, i secondi, invece, sequenze nucleotidiche che, tradotte in polipeptidi, costituiscono la struttura primaria delle molecole che si assemblano per formare le molecole HLA.

Accanto alle caratteristiche simili possedute dai geni di classe I e II troviamo però alcune differenze che si riflettono nelle differenze tra le catene proteiche costituenti le due classi di molecole [4] [5] [6].

##### 2.5.1. I geni HLA di classe I

I geni di classe I sono costituiti da 8 esoni e 7 introni e codificano per la catena pesante (catena  $\alpha$ ) delle molecole HLA di classe I. Questa è la catena che viene definita polimorfica poiché, nonostante venga codificata da regioni e sottoregioni della stessa classe, sono in essa presenti numerosi siti di variabilità, che rendono la sequenza diversa sia da un soggetto all'altro entro la stessa specie, sia tra un cromosoma e l'altro nello stesso soggetto in caso di eterozigosi. In altre parole sono presenti molti alleli diversi che codificano per catene funzionanti. Il primo esone all'estremità 5' codifica per il peptide segnale (SP),

detto anche peptide precursore o sequenza leader (L), che viene tagliato dalla proteina prima del suo ancoraggio sulla membrana. Si succedono poi tre esoni (il 2, 3 e 4) che codificano rispettivamente per il primo, per il secondo e per il terzo dominio esterno della catena pesante  $\alpha$  della molecola HLA, seguiti dall'esone 5, che codifica per il dominio transmembrana, e dagli esoni 6, 7 e 8, che codificano per la regione intracitoplasmatica. La regione terminale del gene contiene infine, all'estremità 3', una sequenza polinucleotidica che viene trascritta ma non tradotta (3' UT). L'elevato polimorfismo della catena  $\alpha$  è dovuto alle sequenze localizzate a livello degli esoni 2 e 3, ed in minor parte all'esone 4, codificanti, come sopra citato, per i tre domini  $\alpha$  [4] [10].

### 2.5.2. I geni HLA di classe II

I geni di classe II sono organizzati in maniera simile ai geni di classe I e codificano per le due catene glicoproteiche polimorfiche  $\alpha$  e  $\beta$ . Dall'estremità 5' si susseguono, intercalati da introni: una sequenza leader non tradotta (5'UT) con una breve sequenza che codifica per i primi due aminoacidi nel gene A e per i primi quattro aminoacidi del gene B; due esoni codificanti in entrambi i geni per i due domini esterni delle catene proteiche ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ); un esone codificante per la porzione transmembrana; tre brevi esoni per la catena  $\alpha$  e due per la catena  $\beta$  codificanti per il segmento intracitoplasmatico; ed infine la porzione terminale costituita da una sequenza 3' UT non tradotta. Da un punto di vista evolutivo, è evidente che i geni HLA derivano da duplicazioni e riarrangiamenti della stessa regione genomica, che ha portato alla presenza di numerosi geni derivati da un gene ancestrale.

### 2.6. Polimorfismo e codominanza dell'HLA

Due caratteristiche importanti dei geni MHC sono l'alto polimorfismo e la codominanza. Il **polimorfismo** sta ad indicare che esistono molte varianti diverse (o "alleli") per ogni gene che codifica per le catene delle molecole HLA [4] [11] [12]. Tale polimorfismo è talmente accentuato che praticamente nessun individuo possiede lo stesso set di geni MHC, tranne i gemelli monozigoti. Poiché il polimorfismo determina quali peptidi sono presentati, ed in ultima analisi il repertorio della risposta immunitaria individuale, l'esistenza di alleli multipli assicura che ci sia sempre qualche membro della popolazione che potrà presentare un peptide antigenico microbico. È stato pertanto suggerito che l'evoluzione e il mantenimento del polimorfismo dell'MHC assicuri che la popolazione non soccomba ad un nuovo microrganismo o ad uno vecchio che muti le sue proteine, poiché almeno qualche individuo sarà in grado di innescare una risposta immune verso gli antigeni peptidici del microbo mutato o nuovamente introdotto. Per quanto riguarda la **codominanza**, essa indica l'espressione, nell'eterozigote per un determinato locus, di un fenotipo diverso da quello dei due soggetti omozigoti per quello stesso locus. Per comprendere questo fenomeno osserviamo prima i geni di classe I. Essi sono di tre tipi, A, B, C e per ognuno di

esse troviamo molti alleli. Ogni allele è responsabile della produzione di una molecola diversa dal punto di vista funzionale ed infine ogni individuo possiede nel proprio patrimonio genetico due copie del locus MHC, uno di origine paterna e uno di origine materna (il set di geni continui sullo stesso cromosoma viene anche definito **aplotipo**). Qualora l'individuo possieda la massima diversità, ossia sei alleli diversi, potrà assemblare 6 molecole HLA differenti. Il medesimo ragionamento può essere applicato per i geni di classe II ma, essendo in questo caso le subregioni -DR, -DQ e -DP che codificano più catene ciascuna (una alfa ed una beta) ed essendo la molecola di classe II un eterodimero di due catene variabili, le possibili combinazioni sono ancora maggiori.

Gli alleli HLA sono caratterizzati da frequenze diverse che variano da una popolazione all'altra e la combinazione degli alleli negli aplotipi rispecchia in linea di massima la frequenza dei diversi alleli in una determinata popolazione. Pertanto la frequenza dei diversi aplotipi dovrebbe essere teoricamente deducibile dalla frequenza dei singoli alleli, tuttavia la casualità dell'associazione dei diversi alleli di ciascun locus negli aplotipi HLA non è sempre rispettata, in quanto alcune combinazioni alleliche si osservano con frequenza minore o maggiore di quanto atteso. Viene così a determinarsi uno squilibrio della associazione gametica, più propriamente detto "linkage disequilibrium" o "associazione gametica preferenziale", che comporta la presenza di aplotipi HLA caratterizzati da frequenze significativamente diverse da quelle teoricamente attese [4] [5] [6].

### 2.7. Distribuzione tissutale delle molecole HLA

Le molecole HLA di classe I e II presentano una distribuzione tissutale assai diversa [7] e differente è anche la loro espressione costitutiva ed in seguito a stimolazione. Le molecole codificate dai geni di **classe I** sono presenti praticamente su tutte le cellule, ad eccezione dei globuli rossi, che, di conseguenza, presentano molto male antigeni di microrganismi intracellulari (ad es. Plasmodium falciparum). La loro espressione è inducibile dagli IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) in particolare, ma anche da TNF e da linfotossine. Tali citochine sono prodotte in particolare durante le infezioni virali: in questo modo è favorita la presentazione dell'antigene e la conseguente morte della cellula infetta. Le molecole codificate dai geni di **classe II** sono, invece, espresse costitutivamente solo dalle cellule immunocompetenti, vale a dire monociti/macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B, cellule epiteliali del timo cellule endoteliali e poche altre. In certe condizioni, come in seguito ad infezioni virali, le molecole di classe II possono comparire sulla membrana di cellule che non le esprimono, in particolare epiteliali di rivestimento e cellule endocrine [5] [6] [10], come conseguenza della loro esposizione all'IFN- $\gamma$ . L'esposizione a citochine quali l'INF- $\gamma$  è responsabile anche di un aumento dell'espressione delle molecole di classe II su macrofagi, cellule endoteliali e cellule di Langerhans



mentre non sembra avere influenza sulle cellule dendritiche linfoidi.

## 2.8. Processazione dell'Antigene e posizionamento del peptide nella molecola HLA

La funzione principale delle molecole HLA consiste nella presentazione di peptidi alle cellule del sistema immunitario. A seconda del tipo di molecola (classe I o classe II), diverso è pure il ruolo che viene da esso svolto.

### 2.8.1. Presentazione dell'antigene sulle molecole HLA di classe II

Le cellule APC possono interiorizzare microbi extracellulari o proteine microbiche attraverso meccanismi diversi. I macrofagi e le cellule dendritiche possono farlo grazie a recettori specifici per componenti strutturali microbiche presenti sulla superficie cellulare o mediante quelli specifici per gli anticorpi o prodotti dell'attivazione del complemento legati ai microbi. I linfociti B interiorizzano proteine che si legano in modo specifico al recettore per l'antigene. Alcune cellule APC possono infine fagocitare microbi o interiorizzare proteine attraverso un meccanismo di pinocitosi senza alcun evento di riconoscimento specifico. In seguito all'interiorizzazione nelle APC attraverso una qualunque di queste vie, le proteine microbiche si trovano all'interno di vescicole detti endosomi o fagosomi che si fondono con i lisosomi formando i fagolisosomi. All'interno di queste vescicole le proteine vengono frammentate da enzimi proteolitici in piccoli peptidi di varia lunghezza e sequenza. Le APC sintetizzano costantemente molecole MHC di classe II nel reticolo endoplasmatico ed ogni molecola porta con sé una proteina chiamata catena invariante che contiene una sequenza chiamata CLIP (class II invariant chain peptide) che si lega strettamente alla tasca della molecola di classe II rendendola inaccessibile. Inizialmente la molecola HLA di classe II viene legata dalla calnexina, che poi lo cede alla cosiddetta catena invariante, la quale si lega alla molecola HLA occupando con questa sua porzione la tasca di legame del peptide. L'intervento della cathepsina L provoca il taglio della catena invariante, che viene così distaccata dall'HLA. Solo la parte che occupava la tasca rimane legata alla molecola HLA; tale frammento è quello denominato CLIP. Quando dal reticolo endoplasmatico gemmano le vescicole esocitiche, esse si dirigono verso la membrana plasmatica, ma nel loro viaggio si fondono con i suddetti fagolisosomi all'interno dei quali, oltre ai peptidi derivati dalle proteine extracellulari e agli enzimi proteolitici troviamo anche proteine simili a quelle di classe II chiamate DM (una forma scarsamente polimorfica di molecola HLA di classe II non classica, capace di legare solo alcuni tipi di peptidi e caratterizzata da un'alta affinità per il CLIP) le quali sottraggono il peptide CLIP all'HLA di classe II permettendo l'associazione di quest'ultima col peptide proveniente dalla vescicola acidificata. Nel caso in cui una molecola di classe II riesca a trovare un peptide che si adatta, questo complesso si stabilizza e raggiunge la superficie della cellula, qualora non lo trovi

viene degradata dagli enzimi proteolitici. Da ogni proteina sottoposta a clivaggio proteolitico nell'ambiente acidificato dei fagolisosomi possono avere origine molti peptidi ma solo pochi possono legarsi alle molecole MHC del singolo individuo. Quindi solo questi peptidi derivati dall'antigene originario, stimolano il sistema immunitario e pertanto vengono definiti epitopi immunodominanti [13].

### 2.8.2. Presentazione dell'antigene sulle molecole HLA di classe I

Le proteine antigeniche possono però essere prodotte anche direttamente nel citoplasma da virus che albergano nelle cellule infettate, da qualche microbo fagocitato che si fa strada attraverso la membrana della vescicola fagocitica e si ritrova nel citoplasma e infine da prodotti di geni alterati o mutati come nei tumori. Tutte queste proteine, così come quelle proprie della cellula che hanno completato il loro ciclo funzionale sono "etichettate" attraverso un piccolo peptide chiamato ubiquitina e caricate in organelli proteolitici cilindrici chiamati proteosomi. Questi complessi multiproteici di notevoli dimensioni presenti nel citosol, costituiti da 28 subunità disposte in 4 anelli sovrapposti di 7 subunità ciascuno e di struttura cilindrica aperta alle estremità, tagliano le proteine con un meccanismo catalitico ed in maniera apparentemente casuale (non ci sono cioè siti di taglio preferenziali), dando origine a frammenti di lunghezza e sequenza variabili ma tali da poter essere montate su molecole MHC di classe I. In seguito al clivaggio i frammenti peptidici vengono spostati dal citosol all'interno del reticolo endoplasmatico da una proteina che si trova sulle membrane di quest'ultimo e definita TAP (Trasportatore Associato alla Processazione dell'Antigene). Anche TAP1 e 2, le subunità che, assemblate in un eterodimero, formano il trasportatore, presentano un polimorfismo, seppur limitato: i loro geni mappano nella regione MHC di classe II, fra DM e DR, assieme ad altri geni detti LMP (che codificano per alcune subunità del proteosoma). Nel lume del reticolo sono presenti le molecole HLA neosintetizzate, che vengono mantenute nella loro conformazione parzialmente assemblata da particolari proteine specifiche (chiamate chaperonine), in particolare - nel caso delle molecole HLA - dalla calnexina. Una seconda chaperonina, la calreticulina, aiuta l'associazione della  $\beta$ 2-microglobulina alla catena  $\alpha$  dell'HLA, e la mantiene in conformazione parzialmente assemblata. A questo punto avviene l'attacco del peptide, grazie all'intervento di un'altra proteina, la tapasina, che permette il trasporto del peptide dal canale formato da TAP1/2 alla tasca dell'HLA. Le molecole MHC di classe I neo-sintetizzate possono legare questi peptidi qualora siano adeguati al legame con la tasca polimorfica presente nella loro struttura mentre, tali peptidi, non possono legarsi a quelle di classe II poiché la tasca è impegnata dal legame con la catena invariante. Se la molecola non trova un peptide da legare, la molecola si presenta instabile e viene degradata, se invece riesce a legarlo si stabilizza e continua il suo viaggio verso la superficie cellulare. Du-

rante questo viaggio le vescicole esocitiche possono fondersi con i fagolisosomi ma i peptidi che in essi si trovano non possono legarsi alle tasche già impegnate delle molecole di classe I mentre potranno farlo, come prima accennato, alle molecole di classe II. In tal modo i peptidi di provenienza citosolica potranno essere legati sole alle molecole di classe I, quelli di provenienza extracellulare solo a quelle di classe II [14][15][16].

### 2.9. Funzione delle molecole HLA

Attraverso la netta distinzione dei due percorsi di presentazione dell'antigene il sistema immune è in grado di rispondere ai microrganismi intracellulari e a quelli extracellulari in modi diversi e diversamente efficaci nel combattere questi due tipi di aggressione.

I microbi extracellulari sono catturati dalle cellule presentanti l'antigene (macrofagi, cellule dendritiche, di Langherans e linfociti B) ed esposte da molecole di classe II che sono espresse prevalentemente su tali cellule. A causa della specificità del corecettore CD4 per la classe II, i peptidi associati alle molecole di classe II sono riconosciute da linfociti T CD4+, i quali, in seguito ad attivazione, vanno incontro a proliferazione e differenziazione in cellule effettrici definite helper.

Queste cellule sono così definite perché, mediante la produzione di citochine, sono di ausilio alla produzione di anticorpi da parte dei linfociti B e all'attivazione dei fagociti, fenomeno, quest'ultimo, che rende più efficaci l'ingestione e la distruzione dei microbi. In definitiva, quindi, attivano i due meccanismi effettrici più efficaci nell'eliminazione dei microbi extracellulari ma meno efficaci nell'eradicazione dei virus e più in generale dei microrganismi che albergano nel citoplasma.

Per quanto riguarda questi ultimi, bisogna permettere che gli antigeni citosolici sono processati e presentati da molecole di classe I, espresse da tutte le cellule nucleate. I peptidi non self, associati a molecole di classe I, sono riconosciuti da linfociti CD8+ e da questa interazione ha origine la proliferazione e la differenziazione del linfocita CD8+ in CTL. Queste ultime uccidono le cellule infettate ed eradicano l'infezione costituendo il più efficace meccanismo per l'eliminazione di microbi citoplasmatici.

In conclusione, la natura della risposta immune è ottimizzata utilizzando diverse caratteristiche del processo di presentazione e riconoscimento dell'antigene.

### 2.11. Associazione tra HLA e malattie

Dopo aver discusso il ruolo fisiologico del sistema HLA nella difesa contro le infezioni e la sua importanza fondamentale nelle reazioni di rigetto ai trapianti, sorvolando sul suo ruolo nel controllo delle neoplasie, si affronta ora il tema dell'associazione tra specifiche varianti alleliche dell'HLA e le patologie, in particolare quelle autoimmunitarie e quelle infettive.

#### 2.11.1. Sistema HLA e patologie autoimmunitarie

Una delle caratteristiche più rilevanti del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni self e non self: i linfociti maturi e funzionalmente competenti sono infatti in grado di riconoscere e rispondere agli antigeni esogeni, ma non possono riconoscere e/o rispondere agli antigeni autologhi. Questa caratteristica è del tutto peculiare del sistema immunitario specifico: tutte le altre cellule e molecole coinvolte nell'omeostasi, nella difesa dell'ospite e nell'infiammazione non sono infatti in grado di discriminare tra self e non self. La perdita di tale proprietà, definita tolleranza verso il self, si traduce in risposte immuni verso i propri costituenti antigenici e la conseguenza di tali reazioni sono le malattie autoimmunitarie. In generale, la predisposizione genetica alle malattie autoimmuni è stato ipotizzata per la prima volta in seguito all'osservazione che, in coppie di gemelli, se uno di essi si ammala di una di queste malattie, l'altro presenta un rischio relativo molto maggiore, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare la stessa patologia e tale rischio è molto maggiore per un gemello monozigote (che sono geneticamente identici) rispetto a quello di un gemello dizigote (che invece sono simili solo per la metà del loro patrimonio genetico). Più in particolare, il legame tra patologie autoimmunitarie ed il sistema HLA è stato riconosciuto in seguito all'osservazione che l'incidenza di alcune malattie genetiche è più alta in soggetti che possiedono uno specifico allele HLA nel proprio genoma rispetto a coloro che non lo possiedono, e trova il suo razionale nel ruolo cruciale che tali molecole svolgono nella maturazione dei linfociti T e nell'induzione delle risposte immuni verso gli antigeni proteici. Nella Tabella 1 viene proposto un elenco di malattie, ciascuna delle quali associata ad uno specifico allele HLA.

**Tabella 1.** Esempi di malattie associate con HLA  
Associazione positiva indica che l'allele aumenta la suscettibilità alla malattia. Il valore del rischio relativo indica di quante volte aumenta la frequenza di malattia nei soggetti che presentano quel determinato allele HLA rispetto a chi non lo possiede

Malattia	Allele HLA	Rischio Relativo
Spondilite anchilosante	B27	90
Sacroileite	B27	45
Malattia Celiaca	DQ2 DQ8	45
Uveite anteriore acuta	B27	10
Sindrome di Goodpasture	DR15	16
Sclerosi multipla	DR15 DQ6	5
Malattia di Graves	DR3	4
Miastenia grave	DR3	3
Malattia di Bechet	B51	24
Coroidite	A29	87
Psoriasi	Cw6	15
Lupus Eritematosus Sistemico	DR3	6
Diabete mellito di Tipo I insulino-dipendente	DR3/DR4 DQ2	~25
Artrite reumatoide	DR4	4
Narcolessia	DR15 DQ6	75

Tale legame non è equiparabile a quello delle malattie monogeniche, nelle quali ad un determinato genotipo corrisponde un determinato fenotipo patologico, ma piuttosto a quello delle malattie multifattoriali, o complesse, nelle quali diversi fattori genetici ed ambientali aumentano il rischio relativo di sviluppare il fenotipo patologico. Sia molecole di classe I sia di classe II sono coinvolte nei meccanismi patogenetici delle malattie autoimmunitarie [17] [18] ed a titolo di esempio, tra le prime, per la forte associazione, si ricorda la spondilite anchilosante in associazione con l'allele B27 (i portatori hanno un rischio relativo 90 volte superiore di sviluppare la malattia rispetto ai non portatori). Tra le patologie associate a determinati alleli di classe II, sulle quali recentemente si è concentrata l'attenzione in base al loro coinvolgimento nella selezione ed attivazione dei linfociti T CD4+ (cellule in grado di regolare sia le risposte umorali che cellulari verso gli antigeni proteici), si ricordano, per la loro importanza epidemiologica e clinica, il diabete di tipo I, la malattia celiaca, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e la narcolessia (Tabella 1).

I meccanismi ipotizzati, mediante i quali potrebbe scatenarsi una risposta autoimmunitaria, sembrano essere molti e fra di essi alcuni sembrano associati ad eventi ambientali quali le infezioni (attraverso la stimolazione policlonale, il mimetismo molecolare o la semplice induzione di uno stato infiammatorio), altri ad eventi endogeni quali un particolare assetto genetico delle molecole che presentano l'antigene. Più spesso però gli eventi che danno il via ai processi immunopatogenetici delle malattie autoimmuni sono una combinazione di eventi ambientali e predisposizione genetica. Per spiegare l'associazione delle malattie autoimmuni con l'ereditarietà di particolari sequenze MHC sono state avanzate diverse ipotesi. Nella prima si pone attenzione sul fatto che la struttura delle molecole MHC condiziona il processo di selezione negativa durante la maturazione dei linfociti T. Se le molecole MHC nel timo di un individuo non possono legarsi alle proteine self con alta affinità, infatti, le cellule T immature rivolte verso tali autoantigeni possono sfuggire alla selezione negativa e maturare fino a raggiungere la completa competenza funzionale. Nella seconda, le molecole MHC di classe II potrebbero influenzare l'attivazione dei linfociti T ad azione regolatrice, la cui funzione normale è quella di prevenire l'autoimmunità. Nella terza, il gene associato alla malattia potrebbe non essere un allele HLA ma un gene diverso localizzato all'interno del locus HLA ed ad esso associato in linkage disequilibrium. Un possibile ruolo di protagonista potrebbe, ad esempio, essere interpretato dai geni coinvolti nella processazione e trasporto degli antigeni come quelli codificanti per i proteosomi e i transporter oppure dai geni codificanti per le citochine codificate dalla regione HLA, come il TNF (tumor necrosis factor). Sempre dal punto di vista della predisposizione genetica, è stato osservato che molti degli antigeni HLA associati con le malattie differiscono dalle molecole non associate solo nella tasca di legame per

l'antigene. Sebbene questa osservazione non sia di per sé sorprendente dal momento che i residui polimorfici delle molecole MHC sono localizzati dentro e intorno alla tasca, considerato il ruolo determinante di entrambe le funzioni svolte dalle molecole MHC – vale a dire la presentazione dell'antigene e il riconoscimento da parte dei linfociti T – questi risultati confermano l'ipotesi che le molecole MHC influenzino lo sviluppo dell'autoimmunità controllando la selezione e l'attivazione dei linfociti T. Analizzando invece il ruolo di **fattori non genetici** coinvolti nelle malattie autoimmunitarie, bisogna ricordare necessariamente le infezioni (sia virali che batteriche), le alterazioni anatomiche tissutali e le influenze ormonali. Le **infezioni** si associano spesso alle manifestazioni autoimmuni ed in effetti prodromi di natura infettiva precedono spesso le manifestazioni cliniche delle malattie autoimmunitarie. I microbi, tuttavia, non rappresentano la causa in sé della patologia e ciò è dimostrato anche dal fatto che non sono isolabili nell'individuo quando la malattia si manifesta e non sono presenti a livello della lesione. Sembra invece che essi ne siano causa in quanto in grado di scatenare o alterare la risposta immune dell'individuo. Questo può avvenire in diversi modi ed il primo di questi è la **stimolazione policlonale**, fenomeno durante il quale molti linfociti a specificità recettoriale diversa vengono attivati contemporaneamente da sostanze che interagiscono con molecole di superficie diverse dal recettore deputato al riconoscimento antigenico. Classico esempio di tale fenomeno è il lipopolisaccaride batterico, il quale è in grado di attivare molti linfociti B e, tra essi, quelli indotti in stato di anergia clonale dai meccanismi di selezione periferica. Altri esempi sono poi noti per l'attivazione dei linfociti T ma, in tal caso, questi superantigeni sembrano legarsi alle regioni variabili, non polimorfiche, del TCR.

Un altro meccanismo possibile innescato dalle infezioni è quello della **cross-reazione** tra antigeni self ed estranei. In questo caso, una normalissima risposta immune verso antigeni microbici e pertanto estranei rivolge il proprio potenziale offensivo verso antigeni del self in quanto presentano determinanti epitopici uguali. Un esempio classico di questo fenomeno, definito mimetismo molecolare, è rappresentato dalla malattia reumatica, nella quale anticorpi anti-streptococcici cross-reagiscono con proteine del miocardio umano. Anche **alterazioni anatomiche tissutali** quali l'infiammazione (secondaria o meno ad infezioni) possono costituire un evento scatenante una risposta autoimmunitaria. Questo fenomeno sembra attribuibile a due distinti processi: da un lato l'evento responsabile dell'infiammazione, quale un trauma o un'ischemia, potrebbe portare all'esposizione di antigeni self normalmente "nascosti", i quali, non essendo riusciti ad indurre nel sistema immunitario uno stato di tolleranza nei loro confronti, vengono riconosciuti come estranei. D'altra parte lo stesso processo infiammatorio può portare ad alterazioni strutturali degli antigeni self con formazione di nuovi determinanti capaci di

evocare reazioni autoimmuni. Infine, fenomeno non ancora compreso nei suoi meccanismi patogenetici, le **influenze ormonali**, eserciterebbero un ruolo fondamentale nelle malattie autoimmunitarie e questo in considerazione del fatto che la gran parte di questo insieme di patologie è più frequente nel sesso femminile. Non è tuttavia ancora certo se siano proprio le influenze ormonali o altri fattori a svolgere il ruolo chiave in questa associazione.

### 2.11.2. Sistema HLA e patologie infettive

Un altro genere di patologie in cui il polimorfismo del sistema HLA può svolgere un ruolo da protagonista per quel che riguarda l'eziopatogenesi così come la prognosi è quello delle **malattie infettive**. Molte di queste infatti, quali l'AIDS, sebbene non possano ovviamente essere considerate malattie genetiche, sono, almeno parzialmente, influenzate da polimorfismi genetici che esercitano un ruolo chiave sia nel ciclo vitale del microorganismo, sia nella risposta immune [19]. Come precedentemente accennato, la grande variabilità allelica delle molecole HLA sia tra gli individui che tra le popolazioni sembra essere riconducibile all'influenza della selezione naturale esercitata da malattie epidemiche infettive che colpiscono gli antenati degli attuali gruppi etnici umani e, la stessa grande variabilità, sembrerebbe fornire al genere umano un ampio spettro di possibilità nel riconoscimento e nella difesa contro agenti infettivi da esso già incontrati nel suo percorso evolutivo così come contro agenti infettivi non ancora incontrati. Come conseguenza di ciò alcuni individui, in base alle loro caratteristiche genetiche, sono in grado di rispondere più efficacemente ad una specifica infezione, altri meno, e questo si può tradurre sia in termini di capacità di eliminare definitivamente l'agente patogeno, sia in una differente manifestazione della malattia ad esso riconducibile. Per rendere in termini più pratici tale concetto illustreremo brevemente le attuali conoscenze sull'importanza dei fattori genetici nell'esito dell'infezione da HIV resi disponibili da studi di associazione.

L'AIDS costituisce una pandemia per l'uomo in quanto, secondo un rapporto dell'OMS, affligge 42 milioni di individui nel mondo ed è causa, se non trattata, della morte nel 90% dei pazienti infettati. L'agente patogeno responsabile di tale sindrome da immunodeficienza acquisita è di tipo infettivo e più precisamente virale: l'HIV (Human Immunodeficiency Virus). Sebbene quindi l'AIDS non possa essere considerata una malattia genetica, il ruolo dei fattori genetici sembra importante ed è stato studiato fin dal 1980 al fine di comprenderne meglio i meccanismi patogenetici e quindi sviluppare nuovi e più efficaci trattamenti. I più importanti ARGs (AIDS restriction genes), ossia geni umani con varianti polimorfiche che influenzano l'esito dell'esposizione o dell'infezione da HIV, possono essere classificati in 4 categorie in base al ruolo principale da essi interpretato: 1. geni coinvolti nell'ingresso del virus, 2.

citochine anti HIV, 3. geni dell'immunità acquisita cellulo-mediata e 4. geni dell'immunità innata.

## Associazione tra HLA e glomerulonefriti

Sono molteplici le malattie renali che sono state descritte associate con HLA. Ci si concentrerà su alcuni esempi di nefropatie, esplorando in maggior dettaglio in che modo alcuni antigeni HLA costituiscono un fattore di rischio.

### 3.1 Glomerulonefrite membranosa idiopatica

La glomerulonefrite membranosa idiopatica (GNM) è stata una delle prime malattie che sono state associate ad antigeni di classe II. È del 1979 infatti la prima segnalazione da parte di Peter Klouda di una forte associazione tra l'antigene HLA-DR3 e la malattia [20]. L'antigene DR3, negli anni successivi, risultò associato a molte malattie su base autoimmunitaria, spostando poi l'attenzione su gli antigeni HLA-DQ, e sui polimorfismi in disequilibrio di associazione con quelli HLA-DR. Solo molti anni più tardi è stato possibile chiarire le basi patogenetiche della GNM, grazie all'identificazione nella maggior parte dei pazienti con la malattia della presenza di autoanticorpi rivolti verso una proteina presente normalmente nei podociti: il recettore di tipo M per la fosfolipasi A2 o PLA(2)R [21] (full text). Solo recentemente [22] (full text) si è potuto dimostrare che la presenza di questi anticorpi è pressoché esclusiva dei soggetti che presentano una determinata variante DQA: la presenza di questa molecola consente la presentazione di un peptide derivato da PLA(2)R con grande affinità ed innesca la risposta autoimmunitaria verso un determinante self in maniera impropria. Ma anche il gene che codifica per PLA(2)R presenta anch'esso dei polimorfismi, e considerando assieme le combinazioni genotipiche per PLA(2)R e HLA-DQA si è potuto accertare che i soggetti che presentano determinate varianti a questi 2 geni sono coloro a maggior rischio di malattia. Da una parte la variante PLA(2)R è responsabile di un repertorio di peptidi a maggiore affinità per HLA-DQ o più immunogenici, che facilita la patogenesi della GNM nel caso sia pura presente nello stesso soggetto la variante HLA-DQ in grado di accogliere quei peptidi e presentarli in maniera efficace [23] (full text) [24] (full text).

### 3.2 La Sindrome di Goodpasture

Nella malattia di Goodpasture (MG), era noto da tempo che autoanticorpi circolanti erano in grado di legarsi ad un particolare determinante del collagene di tipo IV della membrana basale glomerulare (GBM): il cosiddetto dominio *noncollagenous-1* (NC1). Il monomero  $\alpha 3\text{NC1}$  è assemblato nella rete di collagene IV attraverso l'associazione delle catene di collagene  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , e  $\alpha 5$  per formare un cosiddetto protomero a tripla elica. Attraverso l'oligomerizzazione di protomeri  $\alpha 345$  si forma un intreccio di triple eliche. Due protomeri associano con la loro parte C-terminale dei domini NC1, formando un esamero NC1.

La specificità degli autoanticorpi riscontrati nella MG e l'architettura molecolare degli epitopi tessutali



erano però sono sconosciuti. Nello stesso tempo era ben noto che alcuni pazienti con Sindrome di Alport sviluppavano una recidiva di malattia dopo il trapianto di rene, che in questo caso era determinata da alloanticorpi (e non autoanticorpi) diretti contro la GBM. In uno studio recente [25] (full text) sono state valutate le conformazioni degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi nella malattia di Goodpasture e nella nefrite di Alport post-trapianto, con l'intento di trovare indizi sulla patogenesi della glomerulonefrite causata da anticorpi anti-GBM. È stato per questo utilizzato un saggio di immunoassorbimento enzimatico per determinare la specificità degli autoanticorpi circolanti e di quelli legati al rene a domini NC1. L'architettura molecolare delle regioni epitopiche chiave è stata dedotta con l'uso di molecole chimeriche e di un modello tridimensionale della struttura del collagene rilevante (l'esamero  $\alpha 345\text{NC1}$ ). In questo modo è stato possibile dimostrare che nei pazienti con malattia di Goodpasture, erano presenti autoanticorpi sia contro il monomero  $\alpha 3\text{NC1}$  sia contro monomero  $\alpha 5\text{NC1}$  (e meno al monomero  $\alpha 4\text{NC1}$ ), indicandoli chiaramente come gli antigeni bersaglio della risposta auto-anticorpale. Titoli anticorpali elevati alla diagnosi della malattia anti-GBM sono stati pure associati con la perdita definitiva della funzione renale. Gli anticorpi si legano a distinti epitopi sia del monomero  $\alpha 5\text{NC1}$  che del monomero  $\alpha 3\text{NC1}$ , ma non si legano all'esomero  $\alpha 345\text{NC1}$ . Al contrario, nei pazienti Alport con nefrite post-trapianto, gli alloanticorpi si legano alla subunità  $\alpha 5\text{NC1}$  solo in presenza dell'esamero intatto.

Lo sviluppo della malattia di Goodpasture può essere considerata dunque un patologia autoimmune da errata conformazione, che coinvolge una perturbazione della struttura quaternaria dell'esamero  $\alpha 345\text{NC1}$ , inducendo un cambiamento conformazionale patologico delle subunità  $\alpha 3\text{NC1}$  e  $\alpha 5\text{NC1}$ , che a sua volta provoca una risposta autoimmune [25] (full text).

Da tempo è pure noto che l'allele HLA-DRB1\*15:01 è un elemento chiave nella suscettibilità alla malattia anti-GBM, aumentando di 8-9 volte il rischio di GN da anticorpi anti-GBM. La maggior parte degli altri alleli HLA-DR non predispongono gli individui a sviluppare malattie anti-GBM e possono anche essere di protezione, come ad esempio, HLA-DRB1\*01:01 che riduce il rischio di malattia di 2 volte. Più recentemente è stato compreso come la molecola HLA-DRB1\*15:01 sia in grado di presentare un peptide derivato dal collagene di tipo 4: il frammento dall'aminoacido 136 all'aminoacido 146 della catena alfa3 è infatti presentato solo da HLA-DRB1\*15:01 in maniera specifica alla cellule T, che sono quindi in grado di attivarsi ed innescare una risposta autoimmunitaria specifica che causa la GN da anticorpi anti-GBM [26] (full text).

### 3.3 Vasculiti ANCA-positive

Le vasculiti associate ad anticorpi anti citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono malattie sistemiche dei piccoli vasi che comprendono tre sindromi cliniche: la granulomatosi con poliangite (precedentemente

nota come granulomatosi di Wegener), la poliangite microscopica e la sindrome di Churg-Strauss. Le vasculiti associate ad ANCA provocano comunemente insufficienza renale o emorragia polmonare, con un tasso di mortalità del 28% a 5 anni, e causano una sostanziale morbilità a lungo termine. In 2/3 circa dei pazienti sono presenti autoanticorpi diretti contro la proteinasi 3 (una serina proteasi presente nei granuli dei neutrofili) oppure contro un altro componente dei granuli dei neutrofili, come la mieloperossidasi (in circa un ¼ dei casi). Nei primi, la vasculite è anche definita come ANCA anti-proteinasi3, nei secondi invece come ANCA anti-mieloperossidasi. Nel caso della poliangite microscopica, gli ANCA contro la mieloperossidasi sono presenti nel 58% dei casi, mentre nel 26% sono diretti contro la proteinasi3. Alcuni pazienti sono ANCA-negativi, come pure lo sono più del 50% dei pazienti con la rara malattia di Churg-Strauss.

Numerose evidenze hanno confermato un contributo genetico importante alla base delle vasculiti associate alla presenza di ANCA, compresa la presenza di casi familiari. Il fattore genetico che in maniera più convincente determina un rischio di malattia è l'allele HLA-DPB1\*0401. Un altro fattore di rischio per le vasculiti con ANCA è la presenza del raro allele Z (o nullo) del gene della serpina A1 (SERPINA1), che codifica per l' $\alpha 1$ -antitripsina, un inibitore della serina proteasi di cui la proteinasi 3 è uno dei vari substrati. È dibattuto se le sindromi cliniche di granulomatosi con poliangite e di poliangite microscopica rappresentino malattie distinte o siano parte di un unico spettro malattia. Il concetto di un singolo spettro malattia ha portato a strategie di trattamento simili in uso negli studi condotti su pazienti con vasculiti ANCA-associate, a prescindere dal fatto che abbiano granulomatosi con poliangite oppure poliangite microscopica. Un'altra controversia è il ruolo della reattività degli autoantigeni nella patogenesi delle vasculiti associate ad ANCA. La presenza di ANCA è un importante strumento diagnostico ed evidenze in vitro suggeriscono che gli ANCA possono avere un ruolo proinfiammatorio, come pure ci sono evidenze che il trasferimento negli animali di ANCA contro la mieloperossidasi e contro la proteinasi 3 causano una malattia che può imitare, per alcuni aspetti, quella dell'uomo. Così, ANCA contro la proteinasi 3 e ANCA contro la mieloperossidasi sono potenzialmente importanti nella patogenesi della vasculite, ma potrebbero comunque rappresentare degli epifenomeni, piuttosto che essere i veri responsabili della malattia.

In uno studio recente di associazione tra polimorfismi dell'intero genoma e le vasculiti con ANCA sono stati chiariti i fattori genetici di rischio e si è potuto accertare un diverso background genetico per la granulomatosi con poliangite rispetto a quello per la poliangite microscopica [27] (full text). Sono state infatti riconosciute diverse associazioni con la malattia, sia per geni del complesso maggiore d'istocompatibilità, sia per geni non MHC. La granulomatosi con poliangite e la poliangite microscopica sono risultate

geneticamente distinte. È da notare che le associazioni genetiche più importanti sono state riscontrate per le specificità antigeniche degli ANCA, più che con le sindromi cliniche. La presenza di ANCA anti-proteinasi3 è stata associata con HLA-DP e polimorfismi di geni che codificano per l' $\alpha$ 1-antitripsina (SERPINA1) e la proteinasi 3 (PRTN3). La presenza di ANCA anti-mieloperossidasi è risultata invece associata con HLA-DQ. Questo studio ha dunque confermato che la patogenesi delle vasculiti associate ad ANCA ha una componente genetica, che mostra però differenze tra granulomatosi con poliangite e poliangite microscopica. Suggestisce inoltre che la risposta anticorpale contro l'autoantigene costituito dalla proteinasi 3 costituisce un elemento centrale nella patogenesi delle vasculiti con ANCA anti-proteinasi3. Questi dati forniscono supporto preliminare per il concetto che la vasculite con ANCA anti-proteinasi3 sia una sindrome autoimmune differente rispetto alla vasculite con ANCA anti-mieloperossidasi.

### Conclusioni

Sono numerose le evidenze che i geni HLA siano fattori di rischio per malattie renali complesse alla cui patogenesi concorre una risposta anomala del sistema immunitario. Non è stato possibile trattarle tutte in maniera esaustiva, e nella Tabella 2 vengono proposte alcune delle malattie renali nelle quali è stata riscontrata un'associazione con geni HLA.

Al pari di altre malattie complesse, anche nel caso di patologie renali complesse il background genetico influenza il rischio di sviluppare la malattia. Nelle pa-

tologie su base autoimmunitaria, tra i geni maggiormente coinvolti vi sono quelli del complesso maggiore d'istocompatibilità. Anche nel caso di patologie renali, alcuni geni HLA costituiscono fattori importanti di rischio. Di solito, la presenza di alcune varianti dei geni HLA di classe II favoriscono negli individui che li possiedono la presentazione di peptidi derivati per alcune proteine self, in grado di avviare la risposta autoimmunitaria.

Tabella 2. Esempi di patologie renali associate con HLA

Nefropatia	Allele HLA di rischio	Rischio relativo
Membranosa	DRB1*03, DQA1*05	5
Goodpasture	DRB1*1501 DRB1*07	10 0,5
ANCA-positiva	DQA1 DPB1*04:01	- 4
Post-streptococcica	DRB1*03:01	2-3
Depositi di IgA	DRB1*04 DQA1*05	3 0,8
Lupica	DRB1*0301, *1501	3
Churg-Strauss	DRB4	2,5
Da farmaci	DRB1*03	
Da trapianto	HLA incompatibili	

È da notare che il rischio collegato ai diversi alleli HLA è comunque basso, e non è dunque appropriato richiedere la tipizzazione HLA nell'iter diagnostico e di inquadramento della malattia renale.

Nel caso delle malattie renali, lo studio immunogenetico può essere utile per la comprensione della patogenesi della malattia e lo sviluppo di nuove terapie.

### Bibliografia

- [1] Davies DA, Manstone AJ, Viza DC et al. Human transplantation antigens: the HL-A (Hu-1) system and its homology with the mouse H-2 system. *Transplantation* 1968 Jul;6(4):571-86
- [2] Viza DC, Degani O, Dausset J et al. Lymphocyte stimulation by soluble human HL-A transplantation antigens. *Nature* 1968 Aug 17;219(5155):704-6
- [3] Horton R, Wilming L, Rand V et al. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics* 2004 Dec;5(12):889-99
- [4] Carcassi C, et al. Organizzazione genomica struttura ed espressione del sistema HLA da: "HLA: immunogenetica e applicazioni in medicina". Misefari V, Barocchi S; SIMTI, Milano Ed., settembre 2001.
- [5] Klein J, Sato A The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 2000 Sep 7;343(10):702-9
- [6] Klein J, Sato A The HLA system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 2000 Sep 14;343(11):782-6
- [7] Klein J, et al. Natural history of the Major Histocompatibility Complex. New York: John Wiley, 1986.
- [8] Giordano M. The human MHC Complex (HLA). *Minerva Biotecnologica* 1994
- [9] Martinetti M, Romano L, Rossi A, et al. Espressione fisiopatologica delle molecole HLA, da: "Il maggiore sistema di istocompatibilità nell'uomo". Curtoni E, Illeni MT, Reali G; SITS-AICT Ed., 1993
- [10] Capelli E, Galli Stampino L. Nuovi geni HLA di classe I da: "Il maggiore sistema di istocompatibilità nell'uomo". Curtoni E, Illeni MT, Reali G; SITS-AICT Ed., 1993
- [11] Villa ML. La struttura e la funzione delle molecole del maggiore complesso di istocompatibilità da: "Il maggiore sistema di istocompatibilità nell'uomo"; Curtoni E, Illeni MT, Reali G; SITS-AICT Ed., 1993
- [12] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue antigens* 2002 Nov;60(5):407-64
- [13] Busch R, Rinderknecht CH, Roh S et al. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunological reviews* 2005 Oct;207:242-60
- [14] Peaper DR, Cresswell P Regulation of MHC class I assembly and peptide binding. *Annual review of cell and developmental biology* 2008;24:343-68
- [15] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI et al. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Current opinion in organ transplantation* 2008 Aug;13(4):438-44

- [16] Takemoto S, Port FK, Claas FH et al. HLA matching for kidney transplantation. *Human immunology* 2004 Dec;65(12):1489-505
- [17] Jones EY, Fugger L, Strominger JL et al. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature reviews. Immunology* 2006 Apr;6(4):271-82
- [18] Caillat-Zucman S Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue antigens* 2009 Jan;73(1):1-8
- [19] O'Brien SJ, Nelson GW Human genes that limit AIDS. *Nature genetics* 2004 Jun;36(6):565-74
- [20] Klouda PT, Manos J, Acheson EJ et al. Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRW3. *Lancet (London, England)* 1979 Oct 13;2(8146):770-1
- [21] Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 2009 Jul 2;361(1):11-21 (full text)
- [22] Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 2011 Feb 17;364(7):616-26 (full text)
- [23] Lv J, Hou W, Zhou X et al. Interaction between PLA2R1 and HLA-DQA1 variants associates with anti-PLA2R antibodies and membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2013 Jul;24(8):1323-9 (full text)
- [24] Coenen MJ, Hofstra JM, Debiec H et al. Phospholipase A2 receptor (PLA2R1) sequence variants in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2013 Mar;24(4):677-83 (full text)
- [25] Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *The New England journal of medicine* 2010 Jul 22;363(4):343-54 (full text)
- [26] Ooi JD, Chang J, O'Sullivan KM et al. The HLA-DRB1\*15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2013 Feb;24(3):419-31 (full text)
- [27] Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *The New England journal of medicine* 2012 Jul 19;367(3):214-23 (full text)