

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
CURRICULUM IN SCIENZE IMMUNOLOGICHE
E DERMATOLOGICHE

XXIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

***Ruolo della PKA/cAMP dipendente sulla regolazione
dell'espressione di Foxp3 durante il differenziamento delle Treg in
vitro***

TUTOR/RELATORE
Chiar.mo
Prof. Gianni Marone

CANDIDATA
Dott.ssa
Maria Teresa Lepore

CORRELATORE
Chiar.mo
Prof. Giuseppe Matarese

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

INTRODUZIONE	pag.2
• La Proteina Chinasi A	pag.2
• La PKA nei linfociti T	pag.3
• Le cellule T regolatorie	pag.4
• FoxP3	pag.5
• Cellule Treg e PKA/cAMP dipendente	pag.6
SCOPO DELLA TESI	pag.8
RISULTATI	pag.9
• Fosforilazione di CREB nelle cellule Tconv dopo attivazione del TCR	pag.9
• Effetti della PKA sull'espressione del CD25	pag.9
• Ruolo di PKA sull'espressione di FoxP3 nelle iTreg	pag.10
• La PKA modula l'espressione di Ezh2	pag.11
• Ruolo di PKA sul metabolismo cellulare delle Tconv durante la loro differenziazione	pag.11
• Effetto dell'inibizione di PKA nelle Treg appena isolate	pag.12
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.13
MATERIALI E METODI	pag.15
• Purificazione cellulare delle Tconv e Treg	pag.15
• Treg indotte	pag.15
• Western Blot	pag.16
• Seahorse	pag.17
• Citofluorimetria	pag.17
• Analisi statistica	pag.18
FIGURE	pag.19
BIBLIOGRAFIA	pag.25

INTRODUZIONE

La Proteina Chinasi A

La proteina chinasi A dipendente da ciclico AMP (PKA/cAMP) [1] è coinvolta in molti processi cellulari tra cui trascrizione [2], metabolismo [3], ciclo cellulare [4], proliferazione [5] ed apoptosi [6].

In assenza del cAMP la PKA è inattiva e si presenta come un tetramero composto da due subunità regolatorie di dimensioni maggiori, tenute insieme da legami non covalenti a due subunità catalitiche, di dimensioni minori.

Quando due molecole di cAMP legano ognuna delle due subunità regolatorie la PKA si dissocia. La dissociazione porta alla formazione di un dimero formato da due subunità regolatorie alle quali sono legate quattro molecole di cAMP ed alla liberazione delle due subunità catalitiche, in forma monomeriche, che fosforilano residui di serine e treonine di specifici substrati [7]

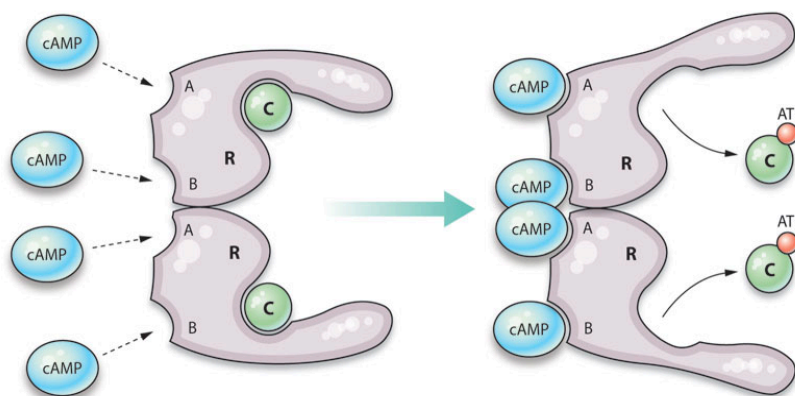


Immagine: *Andrew J. Murray Pharmacology 2008*

Esistono due classi di PKA dette Tipo I (PKA-RI) e Tipo II (PKA-RII) che differiscono per le subunità regolatorie.

Le subunità catalitiche ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$) e le subunità regolatorie ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$, $RII\beta$) hanno diverse proprietà biologiche e sono espresse e distribuite in modo differente a seconda del tessuto o del tipo cellulare [8-9].

La PKA Tipo I è presente nella cellula in forma solubile o ancorata a zattere lipidiche, la PKA Tipo II, in molti tipi cellulari, è legata a strutture cellulari quali Golgi-centrosoma.

Le subunità regolatorie della PKA legano un'ampia famiglia di proteine chiamate AKAPs che svolgono un ruolo di ancoraggio alle membrane [10].

Le proteine AKAPs sono regolatori chiave per la funzione della PKA, ne permettono infatti la giusta localizzazione, nello spazio e nel tempo, per avviare una cascata di segnalazione su substrati specifici. [11-12].

Il cAMP è responsabile dell'attivazione della PKA e la sua concentrazione intracellulare determina la velocità con cui l'enzima fosforila substrati specifici tra cui il fattore trascrizionale CREB [13-14].

Regolatori negativi dell'cAMP sono le fosfodiesterasi (PDEs), una famiglia di enzimi che idrolizzano il cAMP e contribuiscono a creare un gradiente di cAMP che consente di avere una segnalazione controllata [15].

La PKA nei linfociti T

I linfociti sono cellule del Sistema Immunitario (SI) importanti nella risposta immune di tipo adattativo. Vengono suddivisi in linfociti B, che maturando differenziano in plasmacellule e producono immunoglobuline, ed in linfociti T che sono responsabili dei fenomeni di immunità cellulare. I linfociti T si dividono in linfociti T helper (Th) che esprimono in superficie l'antigene CD4 ed in linfociti T citotossici che esprimono in superficie l'antigene CD8.

I linfociti T per esplicare le loro funzioni devono essere attivati tramite stimolazione del recettore delle cellule T (TCR).

E' stato precedentemente dimostrato che nei linfociti T, dopo stimolazione del TCR, si ha aumento dei livelli di cAMP [16].

In queste cellule il cAMP regola negativamente la proliferazione e la produzione di citochine [17] tramite attivazione preferenziale della protein chinasi A (PKA) [18] ed in quantità minore della proteina di scambio attivata dal cAMP (EPAC) [19].

E' noto che nei linfociti l'attività della PKA è associata per l'80% alla PKA di tipo I mentre il 20% è associato alla PKA di tipo II [20].

La PKA di tipo I si trova ancorata alle "zattere lipidiche" della membrana cellulare ed è fisicamente vicina al TCR [21]. Nei linfociti T le zattere lipidiche sono una piattaforma da cui partono i segnali che servono a reclutare complessi proteici coinvolti nella trasduzione dei messaggi di attivazione antigenica. L'integrità delle zattere lipidiche è necessaria per la propagazione del segnale del TCR [22].

I linfociti T sono attivati dopo stimolazione del TCR e la co-attivazione del recettore CD28; a seguito di queste interazioni, si ha una conseguente attivazione dell'AC che porta alla sintesi di cAMP che lega la PKA di membrana attivandola [23].

Le cellule T regolatorie

Le cellule T regolatorie $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^-$ (Treg) sono una sottopopolazione specializzata di linfociti T, derivano dai timociti durante la maturazione intratimica e rappresentano il 10-15% delle cellule $CD4^+$ circolanti.

Le Treg esprimono costitutivamente il CD25, la catena α del recettore ad alta affinità dell'interleuchina 2 (IL-2) ed esprimono FoxP3, gene fondamentale di controllo per il loro sviluppo e la loro funzione. L'attività immunosoppressiva esercitata dalle Treg consente di mantenere la tolleranza periferica al self inibendo la formazione di eventuali cloni di linfociti T reattivi, evitando la comparsa di malattie autoimmunitarie [24].

I meccanismi molecolari attraverso cui le cellule Treg sopprimono l'attivazione e la proliferazione delle cellule T convenzionali $CD4^+CD25^-$ (Tconv) è piuttosto complesso. In numerosi lavori scientifici è stato dimostrato che la soppressione è mediata dall'azione di citochine come IL-10 e del TGF- β [25], altri invece, suggeriscono che le Treg leghino primariamente le cellule presentanti l'antigene (APC) prevenendo l'attivazione delle Tconv [26-27].

Il processo più accreditato a proposito del meccanismo di soppressione, è dato dal contatto diretto tra cellule Treg e Tconv [28].

Ad oggi, la classificazione delle Treg ci dice che esistono almeno tre tipi di cellule Treg, quelle naturalmente differenziate nel timo (nTreg o tTreg) [29], quelle che differenziano in periferia dopo attivazione delle cellule T naive $CD4^+$ (pTreg) [30] e quelle che si generano in vitro a partire dalle Tconv dopo stimolazione del TCR che porta ad un'alta e stabile espressione di FoxP3. Tali cellule sono definite Treg indotte (iTreg) [31-32]. E' stato dimostrato inoltre, che le iTreg hanno una capacità soppressoria paragonabile a quella delle nTreg e che il controllo della loro differenziazione in vitro è fondamentale per la funzione soppressoria [32].

FoxP3

Le Treg hanno molti marcatori che le caratterizzano e conferiscono loro la capacità di sopprimere le Tconv. Il più importante è il fattore trascrizionale FoxP3. Il gene umano FoxP3 contiene 11 esoni codificanti e copre la regione 11.23 del braccio corto del cromosoma X. Questo gene è formato da un promotore e tre sequenze di DNA conservate non-codificanti (CNS). La regione CNS1 contiene un sito di legame per Smad3, attivato in risposta al TGF- β ed è coinvolta nella generazione delle pTreg [33]. La CNS2 è la zona che si attiva in risposta alla stimolazione del TCR. Contiene isole CpG, che sono metilate nelle cellule non Treg. Queste sequenze CpG quando metilate inibiscono il legame dei fattori trascrizionali come CREB e STAT5 che sono necessari per la trascrizione del FoxP3. La CNS3 serve alla generazione delle Treg nel timo e contiene siti di legame per il fattore trascrizionale c-Rel [34].

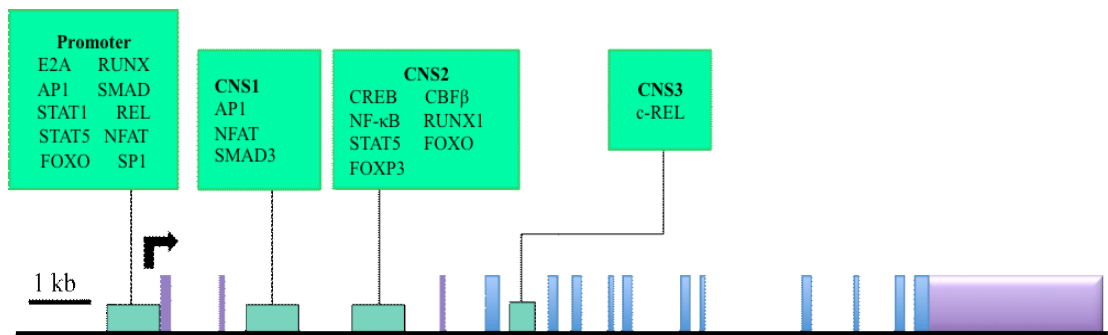


Immagine Stephen M. Hedrick. Review Nature Immunology 2012

La proteina FoxP3 contiene 431 amminoacidi, il suo peso molecolare è 47,25 kD ed è localizzata nel nucleo. Appartiene alla famiglia di proteine “forkhead” così definita per la presenza di un dominio capace di legare il DNA detto FKH (*forkhead*). Questo dominio è situato all’estremità C-terminale ed è importante per la corretta localizzazione nucleare di FoxP3. E’ stato dimostrato che mutazioni in due residui di Lisine nel dominio FKH portano ad una localizzazione citoplasmatica del FoxP3, che ne determina un funzionamento non corretto [35].

Oltre al dominio FKH contiene altri due domini funzionali all’estremità N-terminale, ha un dominio di repressore trascrizionale vicino ad un motivo strutturale C2H2 (Zinc-finger) seguito da un dominio LeuZip (leucine zipper).

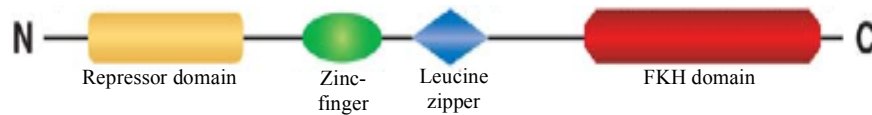


Immagine *Steven F Ziegler Annu. Rev 2006*

E' stato dimostrato che il dominio FKH è fondamentale per la funzionalità delle Treg. La maggior parte delle mutazioni a carico del gene FoxP3 sono localizzate nel dominio FKH e queste mutazioni determinano un cattivo sviluppo e funzionamento delle Treg stesse [36].

La proteina FoxP3 può creare omotetrameri o eterodimeri con altre proteine appartenenti alla famiglia di proteine "forkhead" come ad esempio Foxp1 [32]. E' stato dimostrato che il complesso Foxp1-FoxP3 lega il promotore del gene dell'IL-2 che regola la trascrizione dell'IL-2 dopo l'attivazione delle Treg [37].

La trascrizione del gene FoxP3 è finemente controllata e sue mutazioni portano a patologie autoimmunitarie. Dopo la corretta trascrizione e traduzione la proteina FoxP3 va ad agire come modulatore trascrizionale, attivando o reprimendo la trascrizione di altri geni [38-39]

E' stato dimostrato che l'espressione della variante di splicing di FoxP3 Esone2 (Foxp3-E2) è fondamentale per la capacità soppressoria delle Treg.

Gruppi di studio italiani hanno evidenziato che uno dei modulatori della sua corretta espressione di Foxp3-E2 è la glicolisi [32].

Cellule Treg e PKA/cAMP dipendente

E' noto che le Treg contengono alti livelli di cAMP ed uno dei meccanismi con cui esercitano la loro funzione soppressoria è dato dal trasferimento diretto di cAMP alle Tconv, attraverso le gap Junction [40].

E' anche noto che le Tconv, contengono bassi livelli di cAMP per preservare la loro attivazione [41] e contengono alti livelli di PDEs, gli enzimi che idrolizzano il cAMP

[42-43]. Dopo il trasferimento del cAMP dalle Treg alle Tconv, esso induce la riduzione della produzione di IL-2 e l'inibizione della loro proliferazione [41].

Nelle Treg e nelle Tconv le PDEs sono principalmente attivate dalla molecola costimolatoria CD28, che crea una perturbazione di membrana tale da portare all'avvicinamento della PKA di tipo I, ancorata alle zattere lipidiche, al CD28 con conseguente attivazione della via PKA/cAMP dipendente [23 e 44-45].

SCOPO DELLA TESI

La PKA è la proteina che risente delle variazioni dei livelli di cAMP cellulari. Molti lavori mettono in relazione le variazioni di cAMP e l'immunomodulazione nelle cellule T, in particolare hanno dimostrato che il cAMP produce effetto inibitorio sulla proliferazione di tali cellule. Nel laboratorio in cui ho svolto il mio progetto di Dottorato disponiamo di un sistema di cellule, differenziate in vitro (Tconv versus iTreg) molto ben caratterizzate e ci è sembrato quindi di particolare interesse andare a valutare l'importanza della via di segnalazione PKA/cAMP dipendente nel differenziamento utilizzando il modello delle iTreg.

E' noto che il substrato elettivo della PKA è il fattore trascrizionale CREB che, come descritto in letteratura, è presente sulla regione non codificante (CNS2) del gene FoxP3. Studi finora condotti hanno dimostrato che l'espressione del FoxP3 ed in particolare della variante di splicing esone 2 (FoxP3-E2), sono necessari per la corretta funzione soppressoria delle Treg. Pertanto, abbiamo inizialmente valutato i livelli di fosforilazione di CREB usando un inibitore selettivo che blocca la funzione della PKA. Successivamente abbiamo seguito l'effetto dell'inibizione della PKA, 36 ore dopo l'attivazione del TCR, misurando i livelli di espressione del FoxP3 totale (FoxP3-Tot) e del FoxP3-E2.

RISULTATI SPERIMENTALI

Fosforilazione di CREB nelle cellule Tconv dopo attivazione del TCR

Come precedentemente descritto il fattore trascrizionale CREB è il substrato diretto della PKA. Per comprendere il ruolo di CREB nel nostro sistema sperimentale è stato necessario effettuare una cinetica di induzione. Abbiamo isolato dal sangue periferico di soggetti sani le cellule Tconv e le abbiamo tenute in coltura in presenza o meno di un inibitore selettivo per la PKA (mPKAI) in assenza di siero e successivamente stimulate con anti-CD3/CD28 a diversi tempi. Come mostra la **Fig. 1** la fosforilazione di CREB risulta essere precoce, infatti raggiunge il suo massimo tra i 5 ed i 15 minuti dopo stimolazione con anti-CD3/CD28, parimenti, le Tconv pretrattate per un'ora con l'mPKAI, mostrano una notevole riduzione della fosforilazione agli stessi tempi. Per essere sicuri che la fosforilazione di CREB fosse realmente dipendente dall'aumento di cAMP intracellulare, in parallelo abbiamo studiato la cinetica con 8br (8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, B7880, Sigma-Aldrich) un analogo del cAMP, per gli stessi tempi e nelle stesse condizioni sperimentali. Come si può osservare in **Fig.1B** le Tconv pretrattate con mPKAI mostrano l'inibizione della fosforilazione di CREB a tutti i tempi sperimentali di trattamento con 8br.

Questa prima serie di esperimenti ha consentito di settare il sistema sperimentale in esame ed essere sicuri della sua riproducibilità.

Sulla base dei risultati ottenuti dalla cinetica, tutti i nostri successivi esperimenti, per valutare la fosforilazione di CREB, sono stati condotti a 15 minuti di stimolazione del TCR (vedi **Fig.1C**) in presenza o in assenza dell'inibitore della PKA.

Effetti della PKA sull'espressione del CD25

Per determinare se l'inibizione della PKA avesse effetti sulla differenziazione delle Tconv in Treg, in vitro, abbiamo inizialmente studiato l'espressione del CD25 (porzione α del recettore per l'IL-2). Le Tconv sono cellule CD4⁺CD25⁻ che durante la differenziazione, dopo stimolazione del TCR, esprimono alti livelli di CD25. Le Tconv, pretrattate e non con mPKAI, sono poi state stimulate con anti-CD3/CD28 per

36 ore. Al termine delle 36 ore abbiamo studiato l'espressione del CD25 mediante analisi citofluorimetrica. Come è mostrato in **Fig.2A** si evidenzia l'induzione dell'espressione del CD25 nelle Tconv attivate con anti-CD3/CD28 rispetto al controllo, mentre il pretrattamento con l'mPKAI non ha effetti sulla sua espressione. In parallelo, gli estratti proteici totali delle stesse cellule sono stati analizzati con metodica di western blot, per valutare la fosforilazione di STAT5, fattore nucleare coinvolto nella segnalazione attivata dal recettore di IL-2 e quindi correlata al CD25. In **Fig.2B** si può osservare che nelle Tconv dopo 36 ore di attivazione del TCR, si ha induzione della fosforilazione di STAT5 rispetto al controllo, mentre il pretrattamento con l'mPKAI non ha effetti sulla sua fosforilazione. Le stesse analisi sono state eseguite su Tconv pretrattate e non con mPKAI e successivamente stimulate per 12 e 24 ore con anti-CD3/CD28. Anche in queste condizioni non si evidenziano modulazioni né nell'espressione del CD25 né della fosforilazione di STAT5 (dati non mostrati). Il blocco della PKA, durante la differenziazione delle Tconv in iTreg, non modula né la fosforilazione dello STAT5 né l'induzione del CD25.

Ruolo della PKA sull'espressione di FoxP3 nelle iTreg

Per studiare il possibile coinvolgimento della PKA sull'espressione del fattore trascrizionale FOXP3, abbiamo pretrattato o meno le Tconv con mPKAI e poi indotte a differenziare per 36 ore con anti-CD3/CD28. Gli estratti proteici totali delle cellule sono stati sottoposti ad analisi tramite western blot. In **Fig.3A/3B** è mostrata la consistente riduzione dell'espressione del FoxP3 totale e del FoxP3-E2 nelle Tconv pretrattate con mPKAI. Per confermare questo dato abbiamo anche studiato le Tconv dopo 36 ore di stimolazione del TCR tramite metodica citofluorimetrica. Come si può osservare in **Fig.3C/3D** analizzando solo la porzione di cellule che esprime il CD25^{high} (iTreg) si evidenzia che la proteina FoxP3-E2 **Fig.3D** si riduce in modo significativo nelle cellule pretrattate con mPKAI, invece la proteina FoxP3 **Fig.3C** totale non subisce modulazioni.

La ridotta espressione del FoxP3-E2, osservata nelle Tconv attivate per 36 ore dopo il pretrattamento con mPKAI coincide, per tutti i nostri esperimenti, con la riduzione della fosforilazione di CREB a tempi precoci, come precedentemente mostrato in

Fig.1C. Appare evidente una stretta correlazione tra la riduzione della fosforilazione di CREB nelle Tconv e la riduzione dell'espressione del FoxP3-E2 nelle iTreg. Si può dedurre che la via PKA/cAMP dipendente ha un ruolo importante nel controllo dell'espressione del FoxP3-E2 durante la differenziazione delle Tconv in iTreg.

La PKA modula l'espressione di Ezh2

La trascrizione di FoxP3 è finemente controllata e dopo la sua traduzione agisce anche come fattore trascrizionale negativo di molti geni e lo fa associandosi con altri fattori trascrizionali. Una delle molecole che controlla negativamente la trascrizione del gene del FoxP3 è Ezh2. Questa proteina ha anche capacità di legare il FoxP3, dopo la sua trascrizione ed agire come complesso sulla regolazione di altri geni [46]. Risulta che le Tconv pretrattate con mPKAI e poi stimolate per 36 ore con anti-CD3/CD28 mostrano un aumento significativo dell'espressione dell'Ezh2 rispetto alle Tconv stimulate solo con anti-CD3/CD28 (vedi **Fig.4**).

Ruolo di PKA sul metabolismo cellulare delle Tconv durante la differenziazione

La glicolisi e la fosforilazione ossidativa rappresentano le principali fonti di produzione di energia presenti nella cellula. La maggior parte delle cellule si servono dell'uno o dell'altro a seconda dei cambiamenti ambientali, adattandosi metabolicamente. E' stato dimostrato che il metabolismo cellulare delle pTreg e delle iTreg è importante per la loro formazione e per la loro corretta funzione soppressoria [32 e 47]. Inoltre, è noto anche che l'inibizione della PKA, in cellule non immunitarie, porta alla riduzione della fosforilazione ossidativa [48]. Pertanto, ci siamo chiesti se l'uso dell'inibitore mPKAI sulle Tconv indotte a differenziare in iTreg avesse qualche effetto sulle due principali vie metaboliche: glicolisi e fosforilazione ossidativa. Queste due vie le abbiamo studiate tramite l'utilizzo di un analizzatore di flusso cellulare (Seahorse). L'ECAR (tasso di acidificazione extracellulare) misura l'acidificazione del mezzo in cui si trovano le cellule dopo che è avvenuta la glicolisi, invece l'OCR (tasso di consumo di ossigeno) è un indicatore della respirazione mitocondriale.

Come è possibile osservare in **Fig. 5**. Le Tconv stimulate per 12 ore con anti-CD3/CD28 mostrano una significativa induzione sia della glicolisi **Fig.5B** sia della fosforilazione ossidativa **Fig.5G** a livello basale, rispetto alle cellule di controllo. E' interessante osservare che le Tconv pretrattate con mPKAI hanno una ridotta cinetica dell'ECAR rispetto alle Tconv solamente stimulate con anti-CD3/CD28 **Fig.5** ed hanno una cinetica dell'OCR più alta rispetto alle Tconv solo attivate con anti-CD3/CD28 **Fig.5F**.

Effetto dell'inibizione di PKA nelle Treg

Ci siamo chiesti se la PKA avesse un ruolo nel mantenimento dell'espressione del FoxP3 in cellule nTreg terminalmente differenziate. Le nTreg, isolate da sangue periferico di donatori sani, sono state pretrattate e non con mPKAI per 1 ora e tenute in coltura per 12 ore in presenza di anti-CD3/CD28. Il mattino seguente le cellule sono state raccolte, lisate e gli estratti proteici sono stati analizzati tramite western blotting. In questi esperimenti preliminari **Fig.6** si può osservare che il pretrattamento di un'ora con mPKAI porta ad una conseguente riduzione dell'espressione del FoxP3-E2 **Fig.6A** e non sembra avere effetti sul FoxP3-Tot **Fig.6B**. Questo dato ci fa comprendere l'importanza del ruolo della via di segnalazione PKA/cAMP dipendente anche in cellule già differenziate come le nTreg e ci invita ad indagare ancora sul ruolo che questa via possa avere nel preservare l'espressione del Foxp3.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Le cellule Treg, una sottopopolazione specializzata di linfociti T, sono fondamentali nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria attraverso il controllo della proliferazione di cellule Tconv. La corretta espressione del Foxp3 ed in particolare del Foxp3-E2, è necessaria per lo sviluppo e la funzione soppressoria delle Treg [32]. È stato dimostrato che il meccanismo maggiormente usato dalle Treg per sopprimere le Tconv è mediato dal contatto diretto cellula-cellula attraverso un sistema granzima e perforine dipendente o attraverso l'inoculo, via gap junction, di piccole molecole come il cAMP che riduce la produzione di IL-2 ed inibisce la proliferazione delle cellule T [28].

Finora è stato dimostrato che il cAMP (e quindi la via di segnalazione cAMP/PKA) ha azione inibitoria sulla proliferazione delle Tconv. In questo lavoro di TESI Sperimentale, abbiamo cercato di comprendere il ruolo della via di segnalazione PKA/cAMP dipendente sulla differenziazione delle Tconv in iTreg. Abbiamo mostrato che inibendo, per una sola ora, la PKA si ha una riduzione della fosforilazione del fattore trascrizionale CREB e che questo effetto si traduce, 36 ore dopo, in una significativa riduzione dell'espressione del FoxP3 ed in particolare del FoxP3-E2. Abbiamo anche studiato lo stato metabolico delle Tconv durante la loro differenziazione in iTreg ed abbiamo evidenziato che inibendo la PKA si assiste ad una diminuzione della glicolisi ed in parallelo ad un aumento della fosforilazione ossidativa. Inoltre, con esperimenti preliminari, abbiamo osservato che la via PKA/cAMP dipendente è importante per il mantenimento dell'espressione del FoxP3-E2 nelle Treg direttamente isolate dal sangue periferico. Questo ci porta ad affermare che le Treg sono cellule che hanno una certa plasticità, relativamente agli stimoli ambientali [49]. Pertanto, il nostro approccio sperimentale ci aiuta a comprendere che la via PKA/cAMP dipendente nei linfociti T non solo è importante come inibitore della proliferazione, ma ha anche un ruolo sulla differenziazione delle Tconv in iTreg ed è necessaria per il mantenimento dell'espressione del FoxP3 in cellule Treg appena isolate.

I prossimi esperimenti che eseguiremo punteranno alla comprensione della funzione soppressoria delle iTreg indotte in presenza dell'inibitore selettivo della PKA,

eseguendo esperimenti di coculture tra le iTreg sortate e le Tconv. Cercheremo poi di caratterizzare le iTreg con dosaggi citochinici per comprendere il tipo di destino che stanno intraprendendo. Per chiarire l'aumento di fosforilazione ossidativa, indotta dal pretrattamento con mPKAI, faremo esperimenti mirati alla comprensione dello stato funzionale dei mitocondri. Doseremo le specie reattive dell'ossigeno (ROS) in particolare i radicali dell'ossigeno ed useremo il TMRE, un colorante vitale, che ci consentirà di studiare le differenze di potenziale transmembrana. Questi dosaggi ci serviranno per avere informazioni sullo stato di salute del mitocondrio. Eseguiremo esperimenti volti alla comprensione del ruolo del fattore trascrizionale Ezh2, per chiarire se l'aumento che noi abbiamo evidenziato possa essere messo in relazione con la trascrizione del gene FoxP3 direttamente o associato a Foxp3 per consentire la regolazione di altri geni. Quindi per comprendere se nelle Tconv il pretrattamento con mPKAI induca cambi epigenetici, indagheremo lo stato di metilazione del gene del FoxP3 tramite metodica Chip del fattore trascrizionale CREB e del fattore trascrizionale Ezh2 che sappiamo essere coinvolti nella trascrizione del gene FoxP3 stesso.

In conclusione, il nostro lavoro di Tesi Sperimentale ha indagato un nuovo aspetto che lega la PKA alla funzione sia differenziativa che soppressiva delle cellule Treg umane. I nostri risultati hanno potenziale rilevanza nel contesto della comprensione della biologia di tali cellule ma anche nella creazione di potenziali target terapeutici in condizioni in cui le cellule Treg risultano mal funzionanti come per esempio nell'autoimmunità e nelle allergie.

MATERIALI E METODI

Purificazione cellulare delle Tconv e Treg

Il protocollo di studio riguardante l'utilizzo di cellule umane è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Napoli Federico II ed il consenso informato è stato ottenuto dai donatori sani.

Sono stati isolati i PBMC tramite una centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll. Dai PBMC sono state isolate le Tconv mediante selezione immunomagnetica negativa utilizzando il CD4⁺CD25⁺ Microbead Kit (Miltenyi Biotec).

Le Tconv sono state pretrattate, per 1 ora in tubi da 15 ml (Falcon) ad una concentrazione di 2×10^6 per ml a punto in un volume totale di 1ml di RPMI-1640 (Life Technologies) arricchito con 2 mM di L-glutamina (Gibco-BRL), 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina (Gibco-BRL), con o senza inibitore selettivo della PKAI (Protein Kinase A inhibitor fragment 14-22, myristoylated trifluoroacetate salt (Sigma)) (mPKAI) alla concentrazione finale di 10 µM. Le cellule sono poi state lavate per allontanare l'eccesso di inibitore e stimulate con Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies, 11132D) (anti-CD3/CD28) alla concentrazione di 0,2 biglia per cellula a diversi tempi (5-15-30 min ed 1h).

Le Treg appena isolate sono state pretrattate per 1 ora in tubi da 1,5 ml (Eppendorf) ad una concentrazione di 5×10^5 a punto, poi lavate e stimulate con anti-CD3/CD28 alla concentrazione di 0,2 biglia per cellula per 12 ore.

Treg indotte

Per la generazione delle iTreg, le Tconv sono state pretrattate per un'ora con mPKAI (10 µM) in tubi Falcon da 15 ml.

Dopo l'ora di pretrattamento le Tconv sono state lavate e messe in coltura in piastre da sei pozzetti (Falcon) con, RPMI-1640 (Life Technologies) arricchito con 2 mM di L-

glutamina (Gibco-BRL), 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina (Gibco-BRL) in presenza del 5% di siero umano AB (Euroclone). Le cellule sono state stimulate con Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies, 11132D) (anti-CD3/CD28) ad una concentrazione di 0,1 biglia per cellula per 36 h a 37 °C in presenza del 5% CO₂. Allo scadere delle 36 ore le iTreg sono state recuperate ed usate per diverse analisi.

Western blot

Le Tconv (2×10^6 cellule) e le Treg (5×10^5 cellule) sono state lisate in tampone di lisi Ripa buffer (Sigma-Aldrich) con aggiunta di inibitori di fosfatasi (P5726; Sigma-Aldrich) ed inibitori di proteasi (S8820; Sigma-Aldrich). I lisati cellulari sono stati mantenuti in ghiaccio per 20 min e poi centrifugati (13.000 rpm, 4°C, 10 min). Un'aliquota dell'estratto proteico ottenuto dal lisato cellulare è stata utilizzata per quantizzare le proteine con il metodo BCA Protein Assay Kit. La restante aliquota dell'estratto proteico è stata conservata a -80°C. Gli estratti proteici (20µg per campione) sono stati separati su gel 4-12% Bis-Tris gels (NuPAGE®, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) insieme ad un marker proteico. La membrana è stata poi tenuta per 2 ore a 4 °C in 5% nonfat milk in PBS (Tampone fosfato salino), 0,5% Tween-20, pH 7,5 (PBST) per bloccare i siti di legame non specifici. Le membrane sono state successivamente incubate (4°C, 18 ore) con un anticorpo primario, poi lavate per tre volte in PBST ed incubate (22°C, 1 ora) con un anticorpo secondario coniugato con HRP (Amersham Biosciences). Dopo lavaggio in PBST l'attività di perossidasi è stata detettata con sistema ECL (Amersham Biosciences) o Femto (Pierce). Gli anticorpi usati sono i seguenti: anti-fosfo-S6 (2215, Cell Signaling Technology); anti-ERK ½ (H72, Santa Cruz Biotechnology); anti-Foxp3 totale (PCH101, eBioscience); anti-Foxp3-E2 (150D/E4, eBioscience); anti-fosfo CREB(9196, Cell Signaling Technology); anti-CREB (9197, Cell Signaling Technology); anti fosfo-STAT5 (9351, Cell Signaling Technology); anti-STAT5 (9352, Cell Signaling Technology); anti fosfo-S6 (4858, Cell Signaling Technology); anti-Ezh2 (Cell Signaling Technology) ed anti-MCM7 (SC9966 Santa Cruz Biotechnology). Tutti i filtri sono stati quantizzati mediante analisi densitometrica

delle bande con il programma Imagej64.

Seahorse

Attraverso uno strumento dedicato che analizza il flusso cellulare chiamato Seahorse si possono misurare in tempo reale entrambi i parametri.

Le Tconv pretrattate e non con mPKAI sono state piastrate in piastre XF-96 (Seahorse Bioscience) alla densità di 4×10^5 cellule a pozzetto e messe in coltura con RPMI-1640 (Life Technologies), arricchito del 5% di siero umano AB (Euroclone) e stimulate con anti-CD3/CD28 (0,1 biglia per cellula).

L'OCR (tasso di consumo di ossigeno) è stato misurato in mezzo XF (contenente 10 mM glucosio, 2mM L-glutamina e 1mM sodio piruvato) in condizioni basali ed in risposta a 5 μ M Oligomicina, 1.5 μ M FCCP ed 1 μ M Antimicina e Rotenone (Sigma-Aldrich).

Invece l'ECAR (tasso di acidificazione extracellulare) è stato misurato in mezzo XF in condizioni basali ed in risposta a 10 mM glucosio, 5 μ M Oligomicina e 100mM 2DG (Sigma-Aldrich). Gli esperimenti con il Seahorse hanno seguito queste condizioni: 3 minuti di mescolamento; 3 minuti di attesa e 3 minuti di misurazione.

Citofluorimetria

Dopo 36 ore di coltura le Tconv sono state recuperate e colorate con anticorpi contro antigeni di superficie: CD4-FITC (BD); CD25-PeCy7 (BD). Le cellule, poi, sono state lavate, fissate e permeabilizzate (eBioscience Kit per fissare e permeabilizzare) e poi colorate con anticorpi per proteine intracellulari: Foxp3-PE(PCH101 BD) e Poxp3/E2-PE (eBioscience). La lettura dei campioni è stata effettuata con FACS Canto (BD) e poi i dati sono stati analizzati con software FlowJo (Tree Star).

Analisi Statistica

Gli esperimenti mostrati sono stati ripetuti almeno tre volte. Per ogni punto sperimentale è stata calcolata la deviazione standard della media. I dati sono stati analizzati utilizzando il test t Student o il test ANOVA seguito da Bonferroni post-hoc test. La significatività è stata definita come $p < 0,05$ * e $p < 0,02$ **.

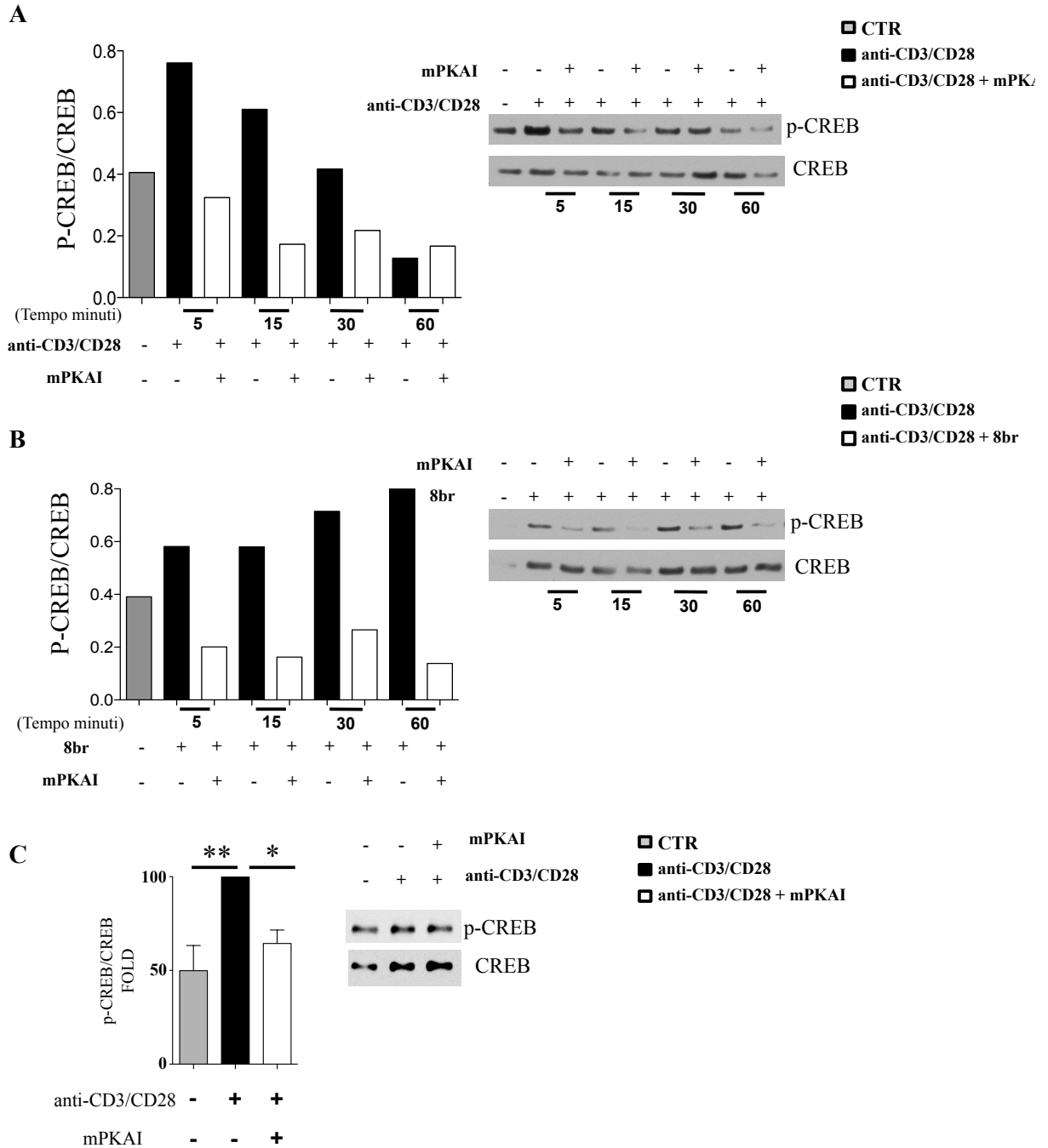


Figura 1 Cinetica della fosforilazione di CREB nelle Tconv

(A) Analisi mediante western blot della fosforilazione di CREB nelle Tconv stimulate con anti-CD3/CD28 in assenza (-) ed in presenza (+) dell'inibitore di PKA (mPKAI). (B) Fosforilazione di CREB in presenza di un analogo del cAMP (8Br cAMP; 100 μ M) usato agli stessi tempi mostrati in A.

I valori di p-CREB riportati nei rispettivi grafici sono stati calcolati normalizzando p-CREB/CREB totale.

(C) Mostra un unico tempo di stimolazione dedotto da A e B. I valori riportati nell'istogramma sono derivati dalla media di 9 esperimenti ed espressi come fold, ponendo il punto trattato con anti-CD3/CD28 come 100%. Il gel mostrato è uno rappresentativo degli esperimenti effettuati.

Per l'analisi statistica vedi materiali e metodi.

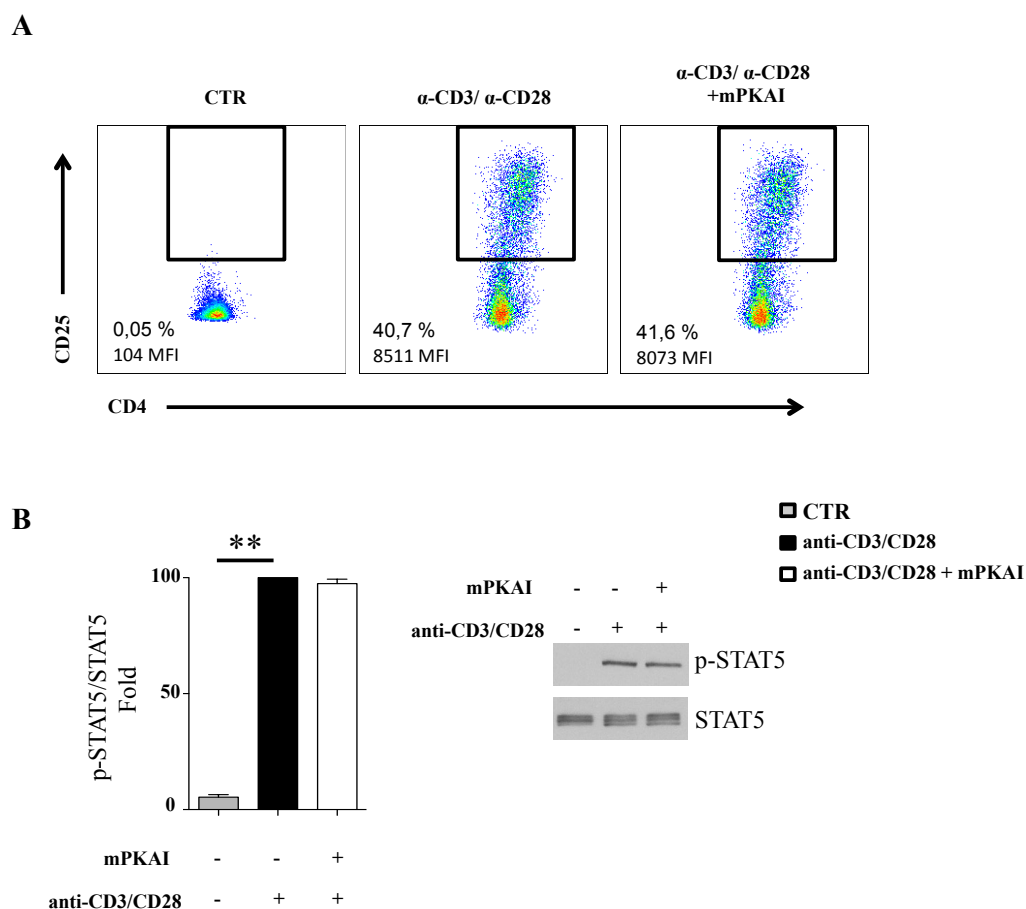


Figura 2 Effetti della PKA sull'espressione del CD25

Le Tconv pretrattate o meno con mPKAI ed indotte o non per 36 ore con anti-CD3/CD28 sono state analizzate tramite citofluorimetria.

(A) L'espressione del CD25 viene indotta dopo stimolazione del TCR rispetto al CTR. Tale induzione non è modificata dal pretrattamento con mPKAI.

(B) Il western blot mostra che dopo stimolazione del TCR vi è un aumento della fosforilazione dello STAT5, statisticamente significativo, mentre il pretrattamento con mPKAI non ne modula l'induzione. I dati sono la media di 5 esperimenti ed il gel mostrato è uno rappresentativo degli esperimenti effettuati.

Il grafico del western blot è mostrato come fold, ponendo le Tconv trattate solo con anti-CD3/CD28 come 100%.

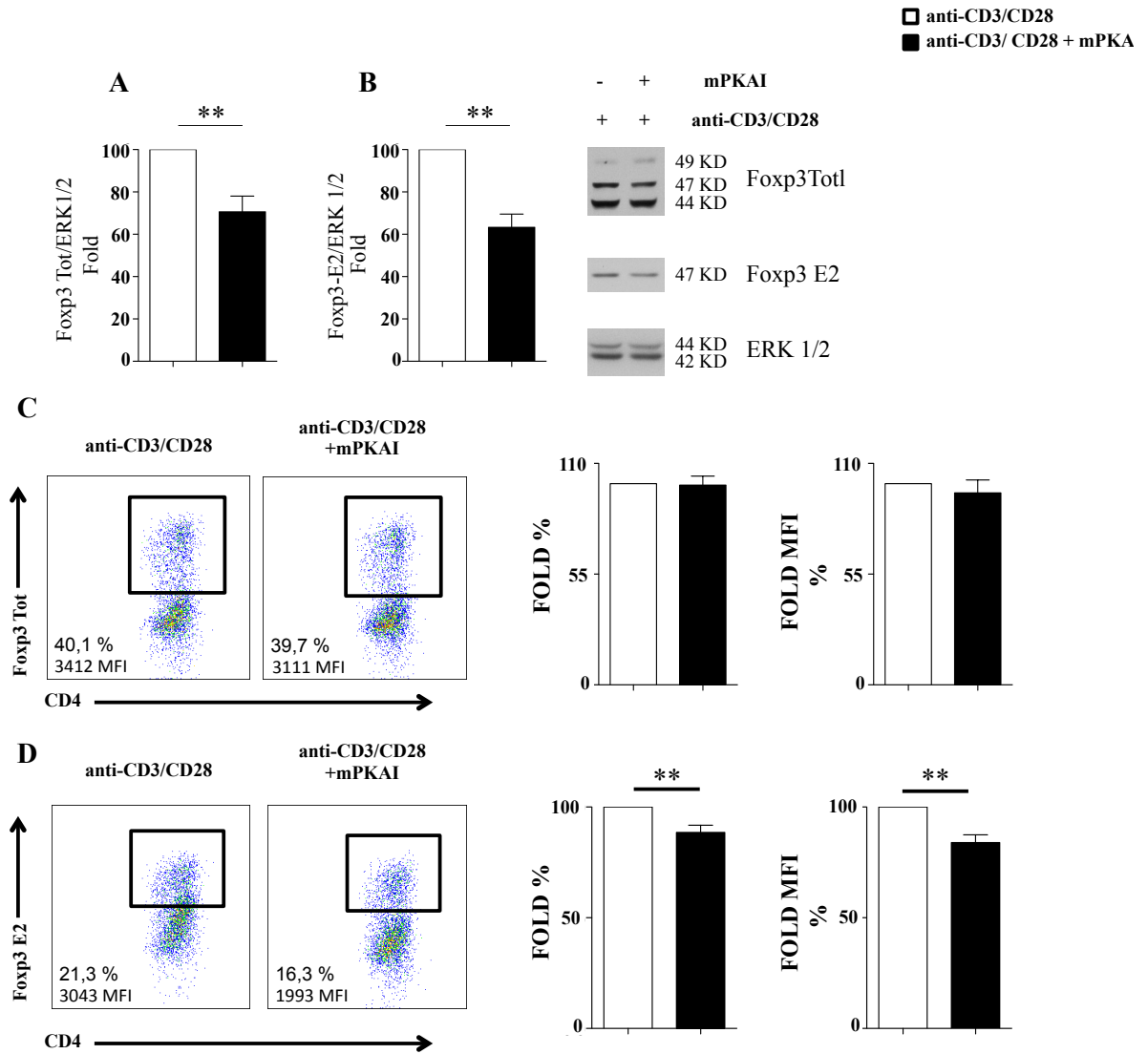


Figura 3 Ruolo di PKA sull'espressione di FoxP3 nelle iTreg

Le Tconv pretrattate e non con mPKAI, sono state attivate con anti-CD3/CD28 e dopo 36 ore gli estratti proteici equivalenti (20µg per campione) sono stati analizzati mediante western blot con anticorpi anti-FoxP3 Tot(A) ed anti-FoxP3-E2 (B). I grafici sono stati riportati come fold ponendo le Tconv trattate solo con anti-CD3/CD28 come 100%. Gli esperimenti sono stati ripetuti 8 volte ed il gel mostrato è uno rappresentativo degli esperimenti effettuati.

In parallelo l'espressione del FoxP3Tot (C) e del FoxP3-E2 (D) è stata analizzata nel 10% della popolazione cellulare CD4+CD25+ (iTreg) al citofluorimetro sia come % sia come intensità media di fluorescenza (MFI).

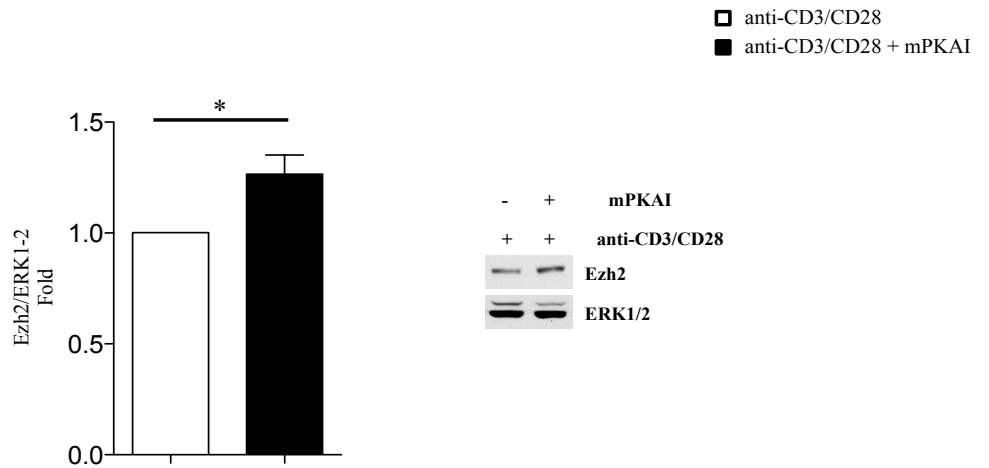


Figura 4 La PKA modula l'espressione di Ezh2

Il western blot mostra l'aumento della quantità di Ezh2 nelle cellule pretrattate con mPKAI rispetto alle cellule stimulate solo con anti-CD3/CD28.

Gli esperimenti sono stati ripetuti 5 volte ed il gel mostrato è uno rappresentativo degli esperimenti effettuati.

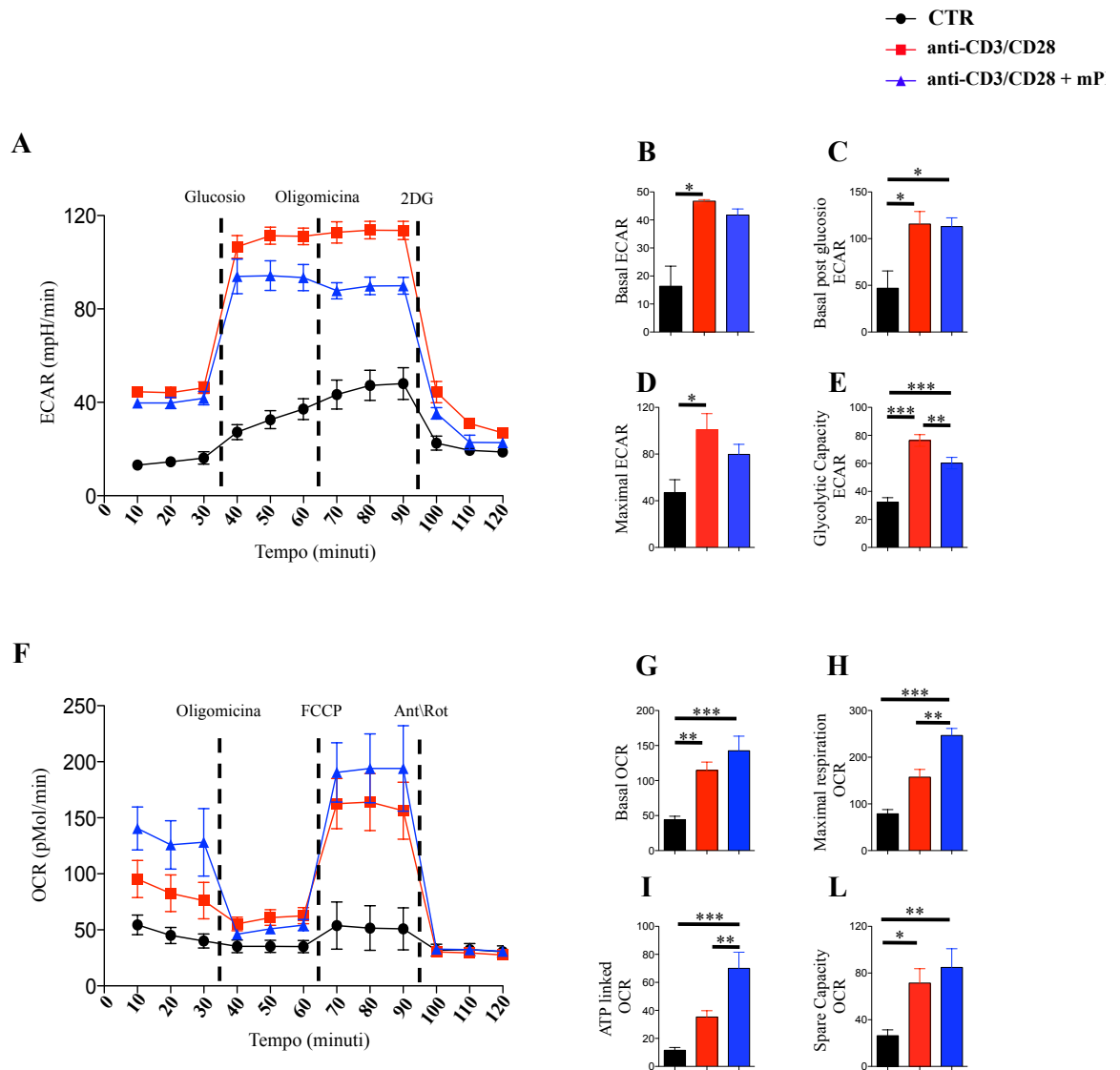


Figura 5

(A) Cinetica dell'ECAR nelle Tconv pretrattate e non con mPKAI e poi indotte per 12 ore in presenza o meno di anti-CD3/CD28. L'ECAR è stato misurato in tempo reale in condizioni basali ed in risposta al glucosio, oligomicina e 2-DG. Gli indici dell'attivazione della glicolisi calcolati dal profilo ECAR: (B) Basal ECAR, (C) Basal post glucosio ECAR, (D) Maximal ECAR e (E) Glycolytic Capacity ECAR.

(F) Cinetica dell'OCR nelle Tconv pretrattate e non con mPKAI e poi indotte per 12 ore in presenza o meno di anti-CD3/CD28. L'OCR è stato misurato in tempo reale, in condizioni basali ed in risposta ad inibitori mitocondriali: Oligomicina, FCCP, Antimicina A e Rotenone (Ant/Rot).

Gli indici di respirazione mitocondriale calcolati dal profilo OCR: (G) basal OCR, (H) Maximal respiration OCR, (I) ATP-linked OCR e (L) Spare capacity OCR.

Questi esperimenti sono stati ripetuti 3 volte ed ognuno in duplicato.

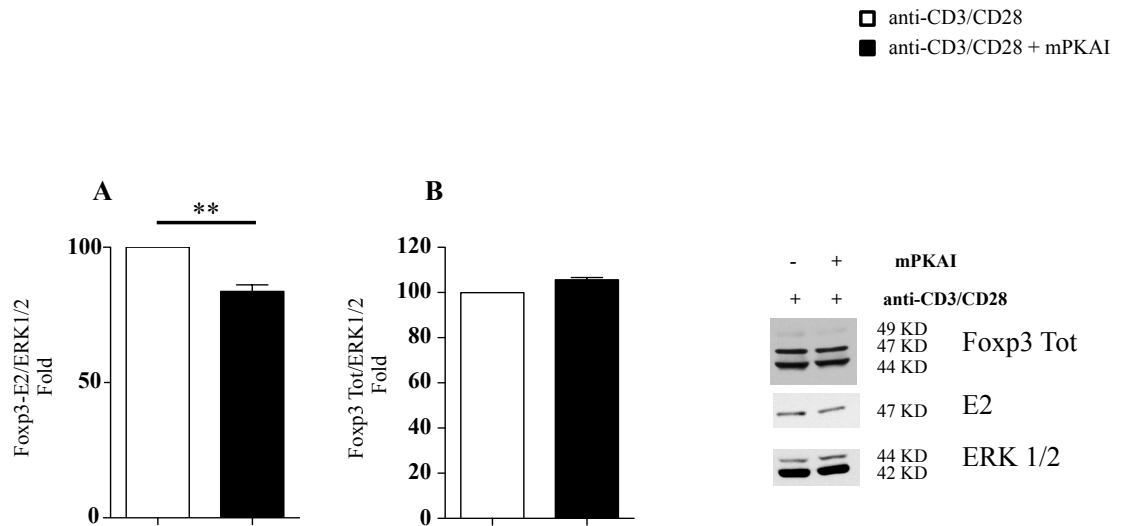


Figura 6 Effetto dell'inibizione di PKA nelle Treg appena isolate

Le Treg appena isolate sono state pretrattate e non con mPKAI e poi stimulate con anti-CD3/CD28 per 12 ore.

Il western blot per FoxP3-E2 (A) e per FoxP3 Tot (B) sono normalizzati su ERK1/2 evidenziando una riduzione di Foxp3-E2 nelle Treg pretrattate con mPKAI. Gli esperimenti sono stati ripetuti 2 volte ed il gel mostrato è uno rappresentativo degli esperimenti effettuati.

BIBLIOGRAFIA

1. Smith JA, Francis SH, Corbin JD. 1993. *Autophosphorylation: a salient feature of protein kinases*. Mol Cell Biochem. 127-128:51-70
2. Huggenvik JI, Collard MW, Stofko RE, Seasholtz AF, Uhler MD. 1991. *Regulation of the human enkephalin promoter by two isoforms of the catalytic subunit of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase*. Mol Endocrinol. 5(7):921-30
3. Hubbard MJ, Cohen P. 1993. *On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation*. Trends Biochem Sci. 18(5):172-7.
4. Matten W, Daar I, Vande Woude GF. 1994. *Protein kinase A acts at multiple points to inhibit Xenopus oocyte maturation*. Mol Cell Biol. 14(7):4419-26
5. Hanaoka K1, Guggino WB. *cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells*. J Am Soc Nephrol. 2000 Jul;11(7):1179-87.
6. Gjertsen BT, Døskeland SO. 1995. *Protein phosphorylation in apoptosis*. Biochim Biophys Acta. 1269(2):187-99.
7. Murray AJ. *Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems*. Sci Signal. 2008 Jun 3;1(22):re4. doi: 10.1126/scisignal.122re4.
8. Skålhegg BS, Taskén K. *Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA*. Front Biosci. 2000 Aug 1;5:D678-93.
9. Taskén K¹, Skålhegg BS, Taskén KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, Sandberg M, Orstavik S, Larsen T, Johansen AK, Vang T, Schrader HP, Reinton NT, Torgersen KM, Hansson V, Jahnsen T. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 1997;31:191-204.
10. Donelson Smith F, Langeberg LK, Scott JD. 2006. *The where's and when's of kinase anchoring*. Trends Biochem Sci. 31:316-323
11. Wong W e Scott JD *AKAP signaling complexes: focal points in space and time* Nat. Rev Mol Cell Biol 2004
12. Taylor SS1, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS. *Dynamics of signaling by PKA* Biochim Biophys Acta. 2005 Dec 30;1754(1-2):25-37. Epub 2005 Sep 22.

13. Smith CM, Radzio-Andzelm E, Madhusudan, Akamine P, Taylor SS. *The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication*. Prog Biophys Mol Biol. 1999;71(3-4):313-41.
14. Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Madhusudan, Cheng X, Ten Eyck L, Narayana N. *Catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase: structure and dynamics of the active site cleft*. Pharmacol Ther. 1999 May-Jun;82(2-3):133-41.
15. Mehats C1, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling*. Trends Endocrinol Metab. 2002 Jan-Feb;13(1):29-35
16. Ledbetter, J. A., M. Parsons, P. J. Martin, J. A. Hansen, P. S. Rabinovitch, and C. H. June. 1986. *Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp44 T cell surface molecules: effects on cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium, and cAMP-mediated suppression*. J. Immunol. 137:3299.
17. Mosenden R1, Taskén K *Cyclic AMP-mediated immune regulation--overview of mechanisms of action in T cells*. Cell Signal. 2011 Jun;23(6):1009-16
18. Rubin CSA *kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP*. Biochim Biophys Acta. 1994 Dec
19. Xiaodong Cheng, Zhenyu Ji, Tamara Tsalkova, and Fang Mei *Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008 Jul; 40(7): 651–662.
20. Skålhegg BS1, Landmark BF, Døskeland SO, Hansson V, Lea T, Jahnsen T. *Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes*. J Biol Chem. 1992 Aug 5;267(22):15707-14.
21. Skålhegg BS1, Taskén K, Hansson V, Huitfeldt HS, Jahnsen T, Lea T. *Location of cAMP-dependent protein kinase type I with the TCR-CD3 complex*. Science. 1994 Jan 7;263(5143):84-7.
22. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. Immunity. 1998 Jun;8(6):723-32
23. Abrahamsen H1, Baillie G, Ngai J, Vang T, Nika K, Ruppelt A, Mustelin T, Zaccolo M, Houslay M, Taskén K. *TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling*. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4847-58
24. Tao JH1,2, Cheng M1, Tang JP1, Liu Q1, Pan F3, Li XP4. *Foxp3, Regulatory T Cell,*

- and Autoimmune Diseases*. *Inflammation*. 2017 Feb;40(1):328-339.
25. Annaker O, Burlen-defranoux et al. 2000. *Regulatory CD4 T cell compartment*. *J.Immunol*. 164:3573-80
 26. Tang Q1, Krummel MF. *Imaging the function of regulatory T cells in vivo*. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):496-502. Epub 2006 Jun 12.
 27. Tadokoro CE1, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):505-11. Epub 2006 Mar 13).
 28. Schmidt A1, Oberle N, Krammer PH. *Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression*. *Front Immunol*. 2012 Mar 21;3:51
 29. Fontenot J.D., Dooley et al *Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny*. *J.Exp. Med* 202, 901-906
 30. Curotto de Lafaille MA1, Lafaille JJ. *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* *Immunity*. 2009 May;30(5):626-35. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.002.
 31. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. *Nat Immunol*. 2013 Apr;14(4):307-8. doi: 10.1038/ni.2554.
 32. De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, Colamatteo A, Santopaolo M, Zuchegna C, Romano A, De Simone S, Procaccini C, La Rocca C, Carrieri PB, Maniscalco GT, Salvetti M, Buscarinu MC, Franzese A, Mozzillo E, La Cava A, Matarese G.*Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants*. *Nat Immunol*. 2015 Nov;16(11):1174-84. doi: 10.1038/ni.3269. Epub 2015 Sep 28.
 33. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. *Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer*. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9(2):194-202. Epub 2007 Dec 23
 34. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY.*Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):808Epub 2010 Jan 13.
 35. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, Anover SD, Ocheltree EL, Ochs HD, Ziegler SF.*Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor*. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3133-42.

36. Ramsdell, F. and S.F. Ziegler, *Transcription factors in autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2003. 15(6): p. 718-24.
37. Li, S., J. Weidenfeld, and E.E. Morrissey, *Transcriptional and D7A binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 809-22
38. Morikawa H, Ohkura N, Vandenberg A, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Standley DM, Date H, Sakaguchi S *Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5289-94.
39. Haiqi H, Yong Z, Yi L. *Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells* *Immunobiology*. 2011 Jun;216(6):678-85. doi: 10.1016/j.imbio.2010.11.002. Epub 2010 Nov 13.).
40. Bopp T, Becker C *et al*, *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression* *J Exp Med* 2007.
41. Johnson KW1, Davis BH, Smith KA *cAMP antagonizes interleukin 2-promoted T-cell cycle progression at a discrete point in early G1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(16):6072-6.)
42. Li L, Yee C, Beavo JA *CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation*. *Science* (1999) 283: 848–851
43. Glavas NA, Ostenson C, Schaefer JB, Vasta V, Beavo JA *T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 6319–6324
44. Giembycz MA1, Corrigan CJ, Seybold J, Newton R, Barnes PJ. *Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2*. *Br J Pharmacol*. 1996 Aug;118(8):1945-58. ;
45. Peter D1, Jin SL, Conti M, Hatzelmann A, Zitt C. *Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D*. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4820-31
46. Yang XP, Jiang K, Hirahara K, Vahedi G, Afzali B, Sciume G, Bonelli M, Sun HW, Jankovic D, Kanno Y, Sartorelli V, O'Shea JJ, Laurence A *EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion*. *Sci Rep*. 2015 Jun 19;5:10643. doi: 10.1038/srep10643.

47. Procaccini C, Carbone F, Di Silvestre D, Brambilla F, De Rosa V, Galgani M, Faicchia D, Marone G, Tramontano D⁵, Corona M, Alviggi C, Porcellini A, La Cava A, Mauri P, Matarese G. *The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements*. Immunity. 2016 Feb 16;44(2):406-21. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.028.
48. Lark DS, Reese LR, Ryan TE, Torres MJ, Smith CD, Lin CT, Neuffer PD. *Protein Kinase A Governs Oxidative Phosphorylation Kinetics and Oxidant Emitting Potential at Complex I*. Front Physiol. 2015 Nov 17;6:332. doi: 10.3389/fphys.2015.00332.
49. Zhou X, *Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo*. Nat Immunol 2009 10(9):1000-1007