

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze

XXI Ciclo

**STUDIO DELLE CARATTERISTICHE FENOTIPICHE E FUNZIONALI DI  
SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE IMMUNOMODULATORIE IN  
PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA**

Diletta Di Mitri

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Dott. Luca Battistini

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

# Indice

1. Capitolo I.....	1
1.1. La sclerosi multipla.....	1
1.1.1. Introduzione .....	1
1.1.2. Eziologia .....	3
1.1.3. Patogenesi .....	5
1.1.4. Trattamenti .....	7
1.1.5. Sviluppo di nuovi trattamenti e prospettive terapeutiche.....	8
2. Capitolo II .....	11
2.1. Il sistema nervoso centrale e la sclerosi multipla.....	11
2.1.1. Il ruolo svolto dalla microglia e dagli oligodendrociti.....	11
3. Capitolo III .....	13
3.1. Il ruolo delle popolazioni linfocitarie nella sclerosi multipla.....	13
.....	13
3.1.1. Infiammazione e autoimmunità .....	13
3.1.2. Linfociti CD8+ .....	15
3.1.3. Linfociti B.....	15
3.1.4. Linfociti $\gamma\delta$ .....	17
3.1.5. Linfociti Th1 e Th17 .....	17
4. Capitolo IV .....	21
4.1. Meccanismi di regolazione immunitaria e cellule T regolatorie.....	21
4.1.1. La regolazione immunitaria nel sano .....	21
4.1.2. Le cellule CD4 T regolatorie nella sclerosi multipla. ....	24
5. Capitolo V .....	26
5.1. I nucleotidi extracellulari e il CD39 .....	26

5.1.1. I nucleotidi extracellulari .....	26
5.1.2. La famiglia dei recettori P2 .....	27
5.1.3. Effetti dell'ATP e dell'adenosina sulla popolazione linfocitaria.....	28
5.1.4. L'ectonucleotidasi CD39 .....	29
5.2. Sintesi dello studio.....	31
6. Capitolo VI.....	33
6.1. Materiali e metodi.....	33
6.1.1. Pazienti.....	33
6.1.2. Anticorpi e reagenti .....	33
6.1.3. Separazione cellulare e marcatura di superficie.....	34
6.1.4. Marcatura intracellulare.....	34
6.1.5. Analisi citofluorimetrica.....	35
6.1.6. Microscopia confocale.....	35
6.1.7. Separazione immunomagnetica .....	35
6.1.8. Saggio di soppressione .....	
6.1.9. Saggio di idrolisi dell'ATP .....	
7. Capitolo VII.....	38
7.1. Risultati .....	38
7.1.1. Il CD39 è espresso costitutivamente da una sottopopolazione CD4+CD25high Foxp3 positiva.....	38
7.1.2. L'espressione del CD39 correla con quella dei principali marcatori regolatori.....	39
7.1.3. Il CD39 individua una sottopopolazione regolatoria dalle caratteristiche memory.....	40
7.1.4. La capacità soppressoria delle cellule CD4 T regolatorie	

è confinata nella frazione CD39 positiva.....	40
7.1.5. La frequenza dei linfociti regolatori CD4+CD25highCD39+ è diminuita nei pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente.....	41
7.1.6. La frequenza della popolazione CD4+CD25highCD39+ risulta aumentata nei pazienti in corso di trattamento con interferon beta. ....	42
7.1.7. Il CD39 conferisce ai linfociti regolatori un'attività ATPasica che appare mantenuta nei pazienti MS .....	43
7.1.8. Il CD39 permette di discriminare tra linfociti regolatori e linfociti effettori recentemente attivati.....	44
7.1.9. La frequenza dei linfociti Th1 e Th17 confinati nella frazione CD4+CD25high risulta aumentata in pazienti MS in fase acuta di malattia.....	45
8. Capitolo VIII .....	47
8.1. Figure .....	47
9. Capitolo IX.....	63
9.1. Discussione.....	63
10. Capitolo X .....	70
10.1. Bibliografia.....	70

# **Studio delle caratteristiche fenotipiche e funzionali di sottopopolazioni linfocitarie immunomodulatorie in pazienti affetti da sclerosi multipla.**

## **1. Capitolo I**

### **1.1. La sclerosi multipla**

#### **1.1.1. Introduzione**

La sclerosi multipla (SM) è una patologia a carattere infiammatorio e patogenesi autoimmune che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC). È contraddistinta da un'insorgenza giovanile e colpisce le donne in rapporto pari a 2:1 rispetto agli uomini (1). L'incidenza varia in base alle aree geografiche, e si assesta intorno agli 1-80 casi ogni 100.000; il Canada, gli Stati Uniti del nord e l'Europa settentrionale sono le aree ove la patologia si manifesta con maggior frequenza.

La sclerosi multipla si colloca nel gruppo eterogeneo delle patologie idiopatiche croniche demielinizzanti; queste patologie sono contraddistinte da una degenerazione della mielina e delle guaine assonali, con conseguente alterazione della velocità di trasmissione degli impulsi nervosi. La disabilità che ne consegue si manifesta a livello delle funzioni motorie, autonome e neurocognitive. Le lesioni si distribuiscono preferenzialmente a livello periventricolare, a livello del

corpo calloso e della sostanza bianca del cervelletto. Zone frequentemente colpite sono anche i nervi ottici e il midollo spinale (1).

La diversa distribuzione e il numero delle placche danno luogo, nei pazienti affetti da sclerosi multipla, ad un'ampia variabilità di manifestazioni cliniche. Resta ancora da comprendere la natura dei fattori che comportano tanta eterogeneità, sebbene l'ipotesi più plausibile sostenga che essa sia legata ad una determinata situazione genetica che conduce, in maniera diversa a seconda degli individui, ad alterazioni della risposta immune così come ad una particolare vulnerabilità del sistema nervoso centrale e alterata capacità di rigenerazione (2).

Le diverse forme della malattia sono state comunque classificate sotto due categorie principali: la forma recidivante - remittente e la forma primaria progressiva. La sclerosi multipla recidivante - remittente è contraddistinta da fasi acute che si manifestano con la comparsa di nuovi sintomi o con l'aggravarsi di sintomi precedenti; queste fasi si alternano a periodiche remissioni in cui si assiste ad uno stato di quiescenza della malattia. Nel 40% dei casi la forma recidivante - remittente sfocia in quella secondariamente-progressiva, caratterizzata da una progressione continua della disabilità. Un'ipotesi in attesa di conferma sperimentale riconosce in queste due forme della malattia la manifestazione di un'unica patologia, che si sviluppa dapprima in seguito all'istaurarsi di aree di infiammazione, ed è poi legata all'innescarsi di un processo strettamente neurodegenerativo (3).

La sclerosi multipla primariamente progressiva segue invece un decorso lento ma costante, privo di riacutizzazioni, durante il quale si accumulano sintomi e lesioni. È generalmente associata ad una non responsività alle immunoterapie, tanto da essere ritenuta da molti una malattia a sé stante (4).

### **1.1.2. Eziologia**

Poco ancora si sa riguardo l'eziologia della Sclerosi Multipla. I dati raccolti finora suggeriscono che sia una patologia ad origine multifattoriale, che si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti che si trovano a vivere in condizioni ambientali favorevoli all'insorgere della malattia stessa. Molteplici sono gli studi che hanno tentato negli anni di svelare la chiave genetica alla base della malattia. Di fatto la Sclerosi Multipla è contraddistinta da un alto livello di familiarità, tanto che i parenti dei pazienti affetti sono esposti ad un rischio dalle 20 alle 50 volte maggiore del normale di sviluppare la malattia. Studi effettuati su gemelli monozigoti hanno inoltre confermato la forte base genetica della Sclerosi Multipla, attestando valori di concordanza intorno al 25% (5). Nonostante le numerose evidenze la ricerca di geni di suscettibilità non ha portato finora a risultati convincenti; i dati più forti sono quelli inerenti alcuni geni nel cromosoma 6p21, nell'area del complesso maggiore di istocompatibilità. Il rischio genetico legato a tali geni si aggira intorno a valori compresi tra il 10 e il 60%, e varia in base all'aplotipo considerato nonché alle popolazioni prese in esame (6).

Molti altri geni sono stati additati come possibili protagonisti nello sviluppo della Sclerosi Multipla; le analisi genetiche perpetuate negli anni, però, hanno purtroppo condotto a risultati spesso disomogenei se non inconclusivi, per via delle diverse metodiche utilizzate e dell'eterogeneità dei campioni presi in esame. L'interesse principale si sta dunque concentrando oggi sulle cause ambientali che concorrerebbero a causare la malattia in soggetti geneticamente predisposti. La prevalenza della Sclerosi Multipla varia considerevolmente a seconda delle aree geografiche considerate; questo ha portato ad indicare come fattori predisponenti elementi quali l'esposizione alle radiazioni UV, all'inquinamento, e ancora elementi presenti nella dieta e nelle abitudini quotidiane.

L'esposizione ad agenti virali è, tra i vari candidati, quello che più ha attirato l'attenzione del mondo scientifico negli ultimi anni. Studi compiuti sul modello animale della Sclerosi Multipla, l'encefalomielite autoimmune sperimentale, hanno portato all'ipotesi ormai condivisa secondo la quale la patologia sarebbe secondaria ad una risposta autoimmune rivolta verso antigeni self. Il modello animale ha messo in luce, infatti, come il requisito fondamentale per l'instaurarsi di un processo autoimmune demielinizzante nel SNC sia proprio rappresentato dall'attivazione nel sangue periferico di cellule T specifiche per gli antigeni mielinici (8,9). L'ipotesi del mimetismo molecolare tra proteine del virus infettante e strutture self espresse dal sistema nervoso centrale, così come di fenomeni di *bystander activation* legati all'infezione di un patogeno, si collocherebbero perfettamente in questo ambito. L'attenzione si è concentrata in particolar modo su quei virus che si distinguono poiché inducono nell'uomo un'infezione carattere cronica, e tra questi il virus neurotrofico Human herpesvirus 6 (HHV6) e quello linfotropico Epstein-Barr virus (EBV). Mentre i dati sierologici e molecolari che mettono in relazione il virus HHV6 con lo sviluppo della malattia sembrano essere controversi (9), più affidabili appaiono i risultati inerenti l'EBV. È stato infatti attestato che il grado di sieropositività del virus è significativamente più elevato nei pazienti rispetto ai sani (10), ed uno studio recente ha rilevato un costante accumulo intracerebrale di cellule B infettate con il virus EBV nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla; questo studio ha inoltre evidenziato un nesso tra la riattivazione del virus nel cervello ed episodi di infiammazione acuta e ricadute (11).



### 1.1.3. Patogenesi

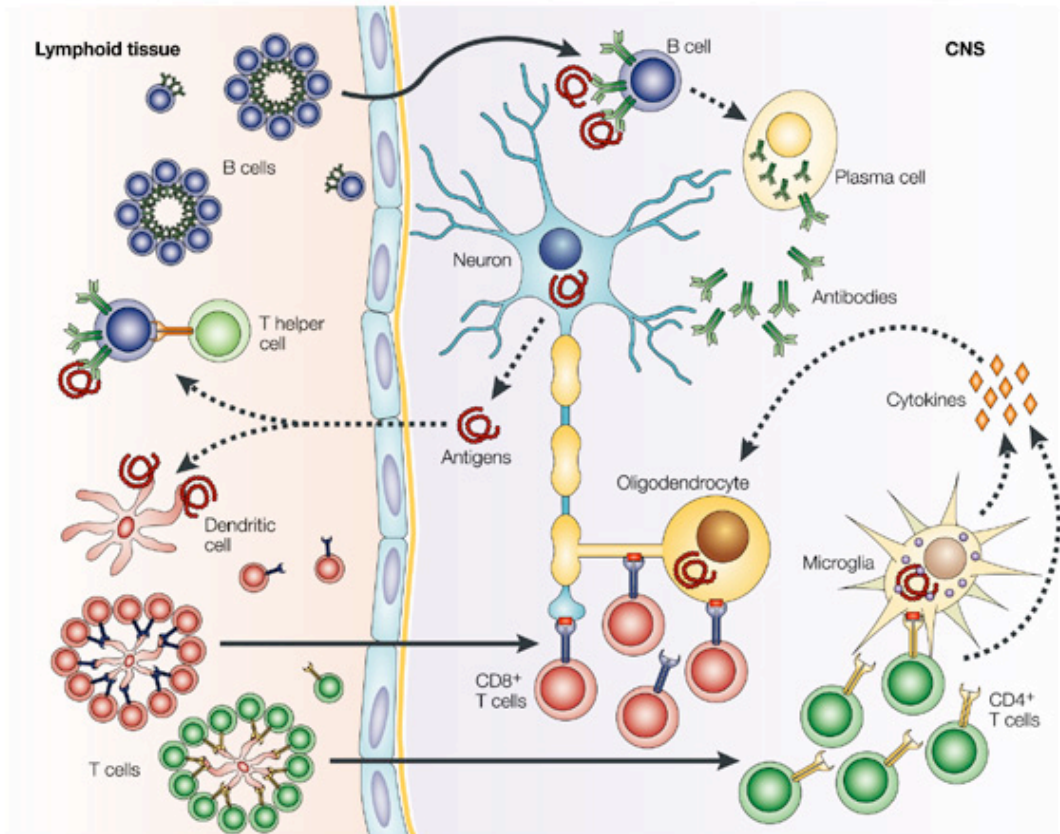
Durante il decorso della Sclerosi Multipla molteplici processi di infiammazione e neurodegenerazione si alternano e si sovrappongono generando placche sclerotiche che rappresentano il vero *hallmark* di questa patologia. L'avvicinarsi di questi processi è piuttosto complesso e l'esatto ordine degli eventi che si verificano nel corso della malattia rimane ancora da chiarire.

L'esordio della malattia è comunque certamente scandito dalla infiltrazione di cellule T e B linfocitarie nel sistema nervoso centrale e nel midollo spinale, attraverso la barriera emato-encefalica, infiltrazione che assume tanto più rilievo se si pensa al sistema nervoso come ad un sito immunologicamente privilegiato. Questa migrazione cellulare conduce al rilascio di citochine pro-infiammatorie che a loro volta promuovono l'attivazione di popolazioni citotossiche cui concretamente vanno attribuite le lesioni a carico delle guaine mieliniche. È infatti generalmente accettato che cellule linfocitarie autoreattive riconoscano la presenza di antigeni mielinici e di microglia e macrofagi attivati, e diano origine allo stato infiammatorio che sfocia in lesioni a carico delle guaine mieliniche con conseguente danno assonale.

Il danno tissutale cui si assiste a livello delle lesioni cerebrali nel corso della Sclerosi Multipla, è determinato da molteplici meccanismi immunologici, appartenenti sia alla risposta adattativa che a quella innata. La distruzione della guaina mielinica si riflette nella fagocitosi degli oligodendrociti frammentati da parte delle cellule macrofagiche tissutali; la presentazione antigenica dei principali epitopi mielinici che ne deriva alimenta la risposta linfocitaria antigene specifica e con essa l'infiammazione stessa.

La Sclerosi Multipla è stata a lungo considerata come una patologia mediata da linfociti T CD4+, sia per via della correlazione con alcuni alleli MHC di classe II

che per la possibilità di indurre la malattia nell'animale mediante il trasferimento di linfociti CD4+ specifici per la mielina. Di fatto, però, le popolazioni cellulari coinvolte nel processo infiammatorio alla base della malattia sono molteplici e i meccanismi patogenetici cui esse danno vita sono tutt'altro che compresi.



Nature Reviews | Neuroscience

Tav. 1: meccanismi patogenetici nella sclerosi multipla

#### **1.1.4. Trattamenti**

La sclerosi multipla è una malattia di natura multifattoriale e il quadro patogenetico che la determina è, come già detto, molto complesso. Tali caratteristiche rendono piuttosto ardua la ricerca di un trattamento risolutivo per i pazienti affetti da questa patologia autoimmune, sebbene molti siano i farmaci messi a punto nel tentativo di curare la sintomatologia e bloccare la progressione.

I farmaci oggi al centro dell'attenzione sono rappresentati per lo più da sostanze immunomodulatorie, il cui ruolo è principalmente quello di spegnere la risposta infiammatoria che genera le placche di demielinizzazione, e bloccare così nel lungo termine il processo neurodegenerativo determinato dall'infiammazione stessa.

I progressi ottenuti in campo diagnostico permettono oggi ai pazienti affetti da sclerosi multipla di iniziare il trattamento precocemente. I farmaci più utilizzati nella terapia della forma remittente - recidivante sono rappresentati dall'interferone beta – commercializzato come Rebif, Betaferon e Avonex- e dal glatiramer acetato – commercializzato come Copaxone-.

Studi recenti suggeriscono che la funzione immunomodulatoria dell'interferon beta sia mediata da una molteplicità di azioni anti-infiammatorie, tra le quali la capacità di antagonizzare le citochine pro-infiammatorie di down-regolare le molecole di adesione necessarie per la migrazione linfocitaria, e di inibire l'attività delle collagenasi ostacolando il passaggio dei linfociti attraverso le membrane endoteliali (49).

Il glatiramer acetato nacque in realtà come un induttore della encefalomyelite autoimmune sperimentale nel topo. Questo farmaco è costituito da una sequenza amminoacidica che emula quella di un antigene mielinico e si è rivelato capace di indurre nell'uomo una sorta di tolleranza immunologica. La sua azione è legata a

molteplici meccanismi, tra i quali la capacità di legarsi alle molecole MHC di classe II alterando la presentazione antigenica ai linfociti autoreattivi e ancora quella di polarizzare la differenziazione linfocitaria in senso Th2 (51). Hong e colleghi hanno inoltre osservato un aumento della popolazione dei linfociti CD4+Foxp3+ con funzione immunosoppressoria nei pazienti sottoposti a trattamento con il glatiramer acetato (50).

Studi clinici controllati effettuati nel corso degli anni hanno dimostrato che sia l'interferon beta che il glatiramer acetato riducono significativamente la frequenza delle recidive e l'accumularsi di nuove lesioni cerebrali demielinizzanti nei pazienti affetti da sclerosi multipla sottoposti al trattamento (52, 53, 54).

### **1.1.5. Sviluppo di nuovi trattamenti e prospettive terapeutiche**

Negli ultimi anni il mondo scientifico ha riservato un notevole impegno alla messa a punto di nuovi farmaci per combattere la sclerosi multipla. Gran parte delle nuove strategie terapeutiche mirano a target immunologici, quali l'attivazione linfocitaria, la migrazione attraverso la barriera emato-encefalica e il coinvolgimento di popolazione cellulari quali linfociti B e cellule Natural Killer.

Il Natalizumab è un farmaco di nuova generazione su cui al momento si sta concentrando grande attenzione; è un anticorpo monoclonale rivolto contro la molecola di adesione linfocitaria VLA-4. Questo anticorpo, in sostanza, impedisce che i linfociti aderiscano alle pareti dell'endotelio vascolare, particolarmente a livello dei vasi cerebrali, riducendo quindi il flusso di cellule infiammatorie all'interno del tessuto nervoso. Questo farmaco è tuttora in uso, con somministrazione mensile, e si è dimostrato utile nel prevenire ricadute nei pazienti affetti da sclerosi multipla. Purtroppo il suo utilizzo è oggi sotto stretto

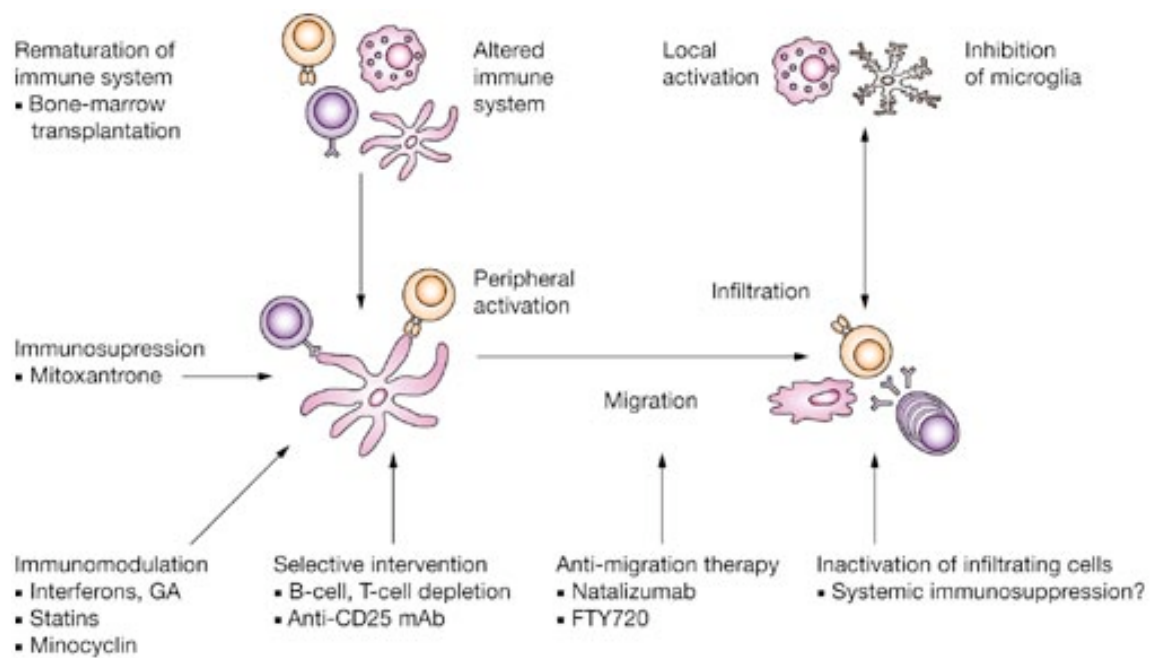
monitoraggio per via della sua connessione con lo sviluppo di forme di PML (leucoencefalopatia progressiva multifocale), probabilmente causate dall'abbassamento delle difese immunitarie nel sistema nervoso centrale in seguito al blocco della migrazione linfocitaria attraverso la barriera emato-encefalica (57, 58).

Al gruppo degli anticorpi monoclonali appartengono poi l'Alentuzumab, diretto contro l'antigene CD52 espresso da linfociti T e B, monociti, macrofagi e eosinofili; e ancora il Daclizumab, specifico per il recettore di attivazione linfocitaria CD25 e il Rituximab, che riconosce il recettore CD20 mediando in tal modo la deplezione di linfociti B. Questi farmaci sono in corso di sperimentazione e mirano alla deplezione di popolazioni cellulari coinvolte nel processo infiammatorio nella sclerosi multipla.

Un'altra classe farmaceutica oggi oggetto di particolare attenzione è quella rappresentata dagli antimetaboliti, tra i quali i Teriflunomide e la Cladribina, rispettivamente un inibitore della deidrogenasi diidrorotato mitocondriale e un analogo dell'ATP. Entrambe le molecole sfruttano l'elevata proliferazione linfocitaria e provocano nei linfociti stessi alterata sintesi nucleotidica e morte cellulare.

Il Fingolimod (FTY720) infine, è un derivato della miriocina che induce down-regolazione del recettore linfocitario S1P e altera così la migrazione dei linfociti potenzialmente autoreattivi verso i linfonodi periferici. Oltre ciò il farmaco si è rivelato in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, inducendo effetti immunomodulatori anche su cellule gliali.

Gran parte dei farmaci di nuova generazione citati è al momento in corso di sperimentazione, e si prevede dunque che entro il 2010 possano essere disponibili nuovi trattamenti che aiutino lo sviluppo di una terapia più personalizzata, e dunque maggiormente efficace, della sclerosi multipla (55, 56).



**Tav. 2:** strategie terapeutiche per la cura della sclerosi multipla.

## **Capitolo II**

### **2.1. Il sistema nervoso centrale e la sclerosi multipla**

#### **2.1.1. Il ruolo svolto dalla microglia e dagli oligodendrociti**

La sclerosi multipla è considerata una malattia autoimmune mediata da linfociti T e ciò ha fatto sì che l'attenzione del mondo scientifico si concentrasse principalmente sul ruolo svolto dalle popolazioni linfocitarie nel processo infiammatorio. Recentemente molteplici studi hanno però permesso di chiarire quanto diverse popolazioni cellulari, che risiedono nel sistema nervoso centrale, siano altrettanto importanti per la modulazione dell'infiammazione stessa.

Il sistema nervoso centrale è un sito immunologicamente privilegiato, ed è reso tale dalla protezione conferitagli della barriera emato-encefalica e dalla presenza di un microambiente immunosoppressivo. Si può dunque supporre che il priming iniziale dei linfociti effettori avvenga nei tessuti linfoidei periferici, in seguito alla migrazione di cellule dendritiche provenienti dal parenchima nervoso. I linfociti attivati attraversano dunque la barriera emato-encefalica e qui subiscono una seconda attivazione interagendo con cellule presentanti antigeni locali, quali in particolare microglia ed astrociti distribuiti in sede perivascolare nella sostanza grigia e nella sostanza bianca (36).

L'espressione da parte della microglia attivata di recettori per l'endocitosi, di molecole MHC di classe II e non ultima la capacità di queste cellule di fagocitare proteine, rende plausibile una loro partecipazione come efficienti APC. Il ruolo svolto dalla popolazione astrocitaria appare invece più controverso. La up-regolazione di molecole MHC di classe II da parte degli astrociti appare infatti

piuttosto limitata, tanto che queste cellule sembrano coinvolte nella presentazione di antigeni lipidici per mezzo di recettori CD1 (37). Dati ottenuti recentemente suggeriscono che l'attività primaria degli astrociti umani possa essere in realtà quella immunosoppressiva: gli astrociti in coltura appaiono infatti capaci di indurre apoptosi linfocitaria e di inibire l'attivazione di delle cellule T attraverso il rilascio di prostaglandine, ed inoltre di bloccare la secrezione di IL12 da parte della microglia in coculture realizzate in vitro (38, 39).

Un'ipotesi piuttosto affascinante vede tanto microglia quanto astrociti protagonisti cellulari in grado generare un microambiente citochinico che moduli la polarizzazione linfocitaria e la migrazione differenziale delle popolazioni Th1, Th17, Th2 e T regolatorie coinvolte nel processo infiammatorio. Le cellule residenti nel sistema nervoso centrale si rivelano dunque indispensabili nella regolazione dell'equilibrio esistente tra linfociti T effettori e linfociti T regolatori; esse sono quindi in grado di rilasciare citochine pro-infiammatorie quali IL12 e IL23 e di promuovere così la differenziazione e l'espansione rispettivamente di linfociti secernenti  $IFN\gamma$  e IL17, e ancora di mediare la chemoattrazione di linfociti effettori e macrofagi attraverso il rilascio di MCP-1, SDF-1 e IP10. Allo stesso tempo il rilascio di citochine quali TGFbeta, IL10, PGE<sub>2</sub> e IL27 contribuisce a spegnere l'infiammazione in atto, promuovendo la differenziazione di cellule regolatorie e inibendo l'azione dei linfociti effettori.



## Capitolo III

### 3.1. Il ruolo delle popolazioni linfocitarie nella sclerosi multipla

#### 3.1.1. Infiammazione e autoimmunità

Il processo infiammatorio che si instaura a livello del sistema nervoso centrale in pazienti affetti da sclerosi multipla ricopre un ruolo da protagonista nella patogenesi della malattia. È proprio all'infiammazione che si deve infatti imputare il danno a carico delle guaine mieliniche e la degenerazione assonale che ne consegue.

L'infiammazione rappresenta un meccanismo di difesa, attraverso il quale l'organismo attaccato da agenti chimici o biologici nocivi si protegge e tenta di eliminare la causa del danno subito. È un processo condotto dalle molteplici componenti del sistema immunitario, dapprima quelle appartenenti alla risposta innata, a cui subentrano ad uno stadio successivo i linfociti, artefici della risposta adattativa. Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è rappresentata dalla capacità di distinguere tra le strutture endogene o esogene che non costituiscono un pericolo e che dunque possono o devono essere preservate (*self*) e le strutture endogene o esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo e che devono quindi essere eliminate (*non-self*). Le patologie autoimmuni, e tra queste la sclerosi multipla, nascono dall'alterazione dei meccanismi che normalmente regolano questo riconoscimento; in questo caso infatti strutture *self* vengono reputate come potenzialmente nocive, e dunque attaccate da linfociti autoreattivi sopravvissuti alla selezione timica.

La risposta innata è la prima linea di difesa dell'organismo, ma funge anche da innesco e ausilio per la risposta immunitaria specifica. Essa si fonda sul riconoscimento di strutture non-self comuni ai patogeni virali o batterici, come LPS e strutture a DNA, da parte di recettori TLR espressi da macrofagi, neutrofili e mast cellule e da alcune popolazioni linfocitarie. Un ruolo importante nelle prime fasi del processo infiammatorio è inoltre rivestito dalla cascata del complemento e dal rilascio di lisozimi, lactoferrina, e ossido nitrico.

La risposta adattativa rappresenta una sorta di evoluzione dell'immunità innata e si distingue per la capacità di adattarsi dinamicamente alla variabilità di agenti ambientali riconosciuti come un pericolo per l'organismo. Essa supplisce alla mancanza di specificità che caratterizza l'immunità innata e lo fa attraverso l'utilizzo di molecole MHC, recettori T (risposta cellulo-mediata) e produzione anticorpale (risposta umorale). La risposta anticorpo mediata si fonda sull'azione dei linfociti B, che differenziandosi in plasma cellule secernono anticorpi antigene specifici; la risposta cellulo-mediata è invece condotta da linfociti T CD4 e CD8. La funzione effettrice dei primi è quella di coordinare la risposta immune attivando linfociti CD8+ e macrofagi (T-helper 1) o linfociti B (T-helper 2) e di sostenere in tal modo il processo infiammatorio. Tale attività è svolta attraverso interazioni cellula-cellula o mediante rilascio di citochine. Le cellule CD4 Th1 e Th17 in particolare, svolgono un ruolo essenziale nella patogenesi della sclerosi multipla: tra di esse si annidano, infatti, i linfociti autoreattivi che, una volta attivati, secernono citochine pro-infiammatorie, quali IL2 e IFN $\gamma$ , IL17 e IL22. Ai linfociti CD8 spetta invece la funzione di lisare le cellule bersaglio, grazie alla produzione delle linfochine; il danno assonale che si osserva nei pazienti affetti da sclerosi multipla è in gran parte dovuto all'azione di questa popolazione citotossica.

### **3.1.2. Linfociti CD8+**

Sebbene l'attenzione del mondo scientifico si sia per anni concentrata sui linfociti T CD4, studi recenti hanno suggerito la possibilità che anche i linfociti CD8 citotossici siano coinvolti nello sviluppo della Sclerosi Multipla. Nel modello murino dell'encefalomielite demielinizzante di Theiler, ad esempio, il danneggiamento mielinico dipende strettamente da un'azione antivirale mediata dai linfociti CD8+, dimostrando come una popolazione CD8 citotossica possa indurre infiammazione a livello cerebrale, con conseguente demielinizzazione e danno assonale. Di fatto, a livello delle placche, il numero delle cellule CD8 citotossiche granzyme B positive supera quello delle altre popolazioni cellulari, e la frequenza di linfociti CD8 citotossici mielino-specifici risulta aumentata tanto nel liquido cerebro-spinale quanto nel sangue periferico dei pazienti rispetto ai donatori sani (13, 14, 15). L'attivazione dei linfociti CD8+ sarebbe mediata dall'interazione con neuroni e cellule gliali che esprimono molecole MHC di classe I, il che le farebbe divenire target preferenziali di questa popolazione linfocitaria (12, 16).

### **3.1.3. Linfociti B**

Uno dei marker più consistenti di Sclerosi multipla, tanto da essere considerato un elemento fondamentale per la diagnosi, è la sintesi intratecale di immunoglobuline e la presenza di bande oligoclonali nel liquor, sebbene i tentativi finora compiuti al fine di individuare la specificità di tali immunoglobuline si siano rivelati piuttosto problematici. Nonostante ciò risultati recentemente ottenuti portano ad attribuire ai linfociti B un ruolo prominente nella patogenesi della sclerosi multipla (22). Già nel 1979 Primeas e colleghi riscontrarono la presenza di tessuto linfoide nelle

meningi di pazienti affetti da Sclerosi Multipla (23), tessuto che è risultato poi composto da follicoli germinativi costituiti in buona parte da linfociti B (24). In aggiunta a ciò, numerose sono le cellule B e le plasmacellule infettate dal virus Epstein Barr che infiltrano la sostanza bianca dei pazienti (25). Infine la risposta positiva dei pazienti trattati con Rituximab, un anticorpo monoclonale rivolto contro il recettore B-linfocitario CD20, conferma un possibile coinvolgimento dei linfociti B nella patogenesi della sclerosi multipla (26).

Seguendo l'ipotesi al momento più accreditata, è possibile sostenere che lo stato infiammatorio indotto a livello del sistema nervoso centrale dai linfociti T infiltranti, alteri la selettività della barriera emato-encefalica e comporti un rilascio di chemochine da parte dei macrofagi e della microglia. L'instaurarsi di una situazione simile permetterebbe ai linfociti B di migrare nella sostanza bianca e qui attivarsi e differenziare in plasma cellule in seguito ad un effetto bystander o a causa di superantigeni virali.

La tossicità B-mediata è dovuta a molteplici meccanismi: in seguito ad attivazione i linfociti B si differenziano in plasma cellule che secernono anticorpi contro proteine virali ed auto-anticorpi che portano al reclutamento macrofagico ed all'attivazione della via del complemento. Ciò potrebbe contribuire al processo di demielinizzazione ed alla formazione delle placche.

La specificità degli anticorpi rilasciati è tuttora oggetto di discussione; sono stati riscontrati, nei pazienti affetti da sclerosi multipla, anticorpi contro antigeni mielinici, così come contro proteine neuronali quali la neurofascina e la  $\alpha\beta$ -cristallina (27, 28). A conferma del coinvolgimento virale, inoltre, è stato recentemente riscontrato un aumento del titolo anticorpale contro antigeni EBV-specifici nel liquor dei pazienti affetti da malattia (25, 29).

### **3.1.4. Linfociti $\gamma\delta$**

I risultati finora ottenuti circa il coinvolgimento dei linfociti T  $\gamma\delta$  nella patogenesi della sclerosi multipla sono piuttosto controversi. Il modello murino attribuisce a questa popolazione linfocitaria sia un ruolo regolatorio che un'azione potenzialmente dannosa per il sistema nervoso centrale. Nel 1993 Hvas e colleghi osservarono nell'uomo la presenza di linfociti  $\gamma\delta$ , principalmente V $\delta$ 2, in concomitanza delle aree di demielinizzazione (19) e studi successivi hanno attestato un aumento della frequenza dei linfociti  $\gamma\delta$ , tanto V $\delta$ 1 quanto V $\delta$ 2, nel liquido cerebrospinale (17). L'azione pro-infiammatoria di queste popolazioni cellulari sarebbe legata alla capacità di secernere citochine attivatorie (18); i linfociti  $\gamma\delta$  separati ex vivo si sono inoltre rivelati in grado di lisare cellule oligodendrocitarie, probabilmente attraverso un riconoscimento di heat shock proteins, death receptors e molecole MHC di classe I da parte di proteine linfocitarie (21). Una menzione particolare va fatta alla popolazione citotossica  $\gamma\delta$  CD16 positiva, la cui frequenza risulta aumentata nel sangue periferico di pazienti affetti da sclerosi multipla e sembra inoltre correlare con la severità e la durata della malattia (20).

### **3.1.5. Linfociti Th1 e Th17**

Sebbene alla base dello sviluppo della sclerosi multipla vi siano meccanismi immunologici piuttosto complessi, il ruolo principale della patogenesi di questa malattia viene attribuito ai linfociti CD4 positivi. Ciò è dovuto a molteplici evidenze, derivanti in buona parte da studi effettuati sul modello sperimentale murino. L'EAE è una patologia che può essere trasferita attraverso l'inoculazione

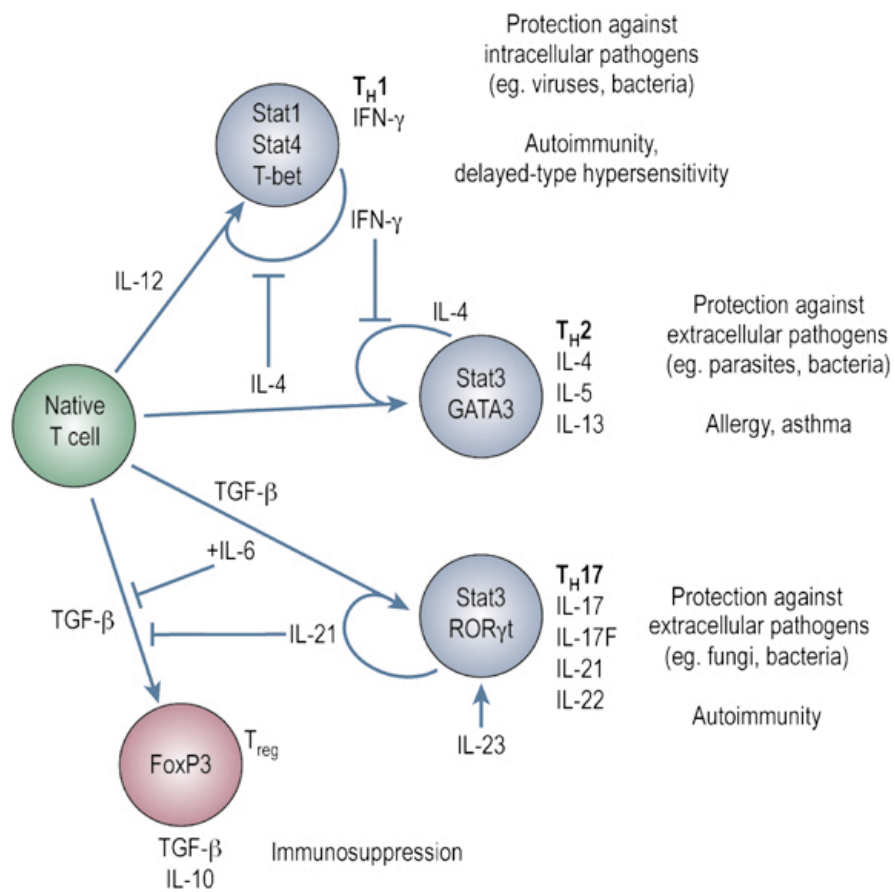
di linfociti CD4 mielino-specifici riattivati in vitro, e non per via, ad esempio, di autoanticorpi, e questo suggerisce la natura autoimmune, mediata dai linfociti T, della malattia nell'animale. Inoltre nell'uomo è stato ormai attestato il legame genetico della sclerosi multipla con mutazioni dei loci HLA-DR e DQ ed infine, i processi che coinvolgono il rilascio anticorpale nonché l'attivazione dei linfociti CD8+, dipendono strettamente dal ruolo delle cellule helper CD4 positive.

I linfociti CD4 helper naive sottoposti a stimoli specifici danno origine a diverse sottopopolazioni memoria linfocitarie, classificate in cellule Th1 e Th2 secernenti rispettivamente IFN $\gamma$  e IL4 e cellule Th17 caratterizzate dal rilascio di IL17. E' ormai attestato come tanto nel sano quanto nel paziente sia possibile riscontrare la presenza di linfociti T mielino-specifici, linfociti cioè sfuggiti alla selezione negativa avvenuta nel timo. Da questi linfociti potenzialmente autoreattivi scaturisce, in determinate condizioni genetiche ed ambientali, la risposta autoimmune alla base della sclerosi multipla.

L'importanza ricoperta dalla popolazione Th1 nella patogenesi della sclerosi multipla è stata comprovata da molteplici evidenze: ad esempio, il trattamento di 18 pazienti con IFN $\gamma$  ha condotto all'esacerbazione della patologia (30); inoltre Moldovan e colleghi hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra la risposta di linfociti Th1 stimolati in vitro con antigeni della mielina e la progressione della malattia nei pazienti presi in esame (31). I dati relativi alla popolazione Th17 sono piuttosto recenti, e il ruolo di questa popolazione nella patogenesi della malattia è ancora da definire. Di fatto comunque la somministrazione di anticorpi anti-IL17 previene l'induzione di EAE nel topo e livelli elevati di IL17 sono stati riscontrati sia nel liquor che nelle lesioni dei pazienti affetti da sclerosi multipla (32, 33). Dati recenti mostrano inoltre come in alcuni pazienti sia possibile riscontrare una risposta ben distinta, con rilascio di IFN $\gamma$ , IL17, IL4 e IL5, alla stimolazione con antigeni mielinici presentati da

APC, in condizioni vicine a quelle fisiologiche. In questi pazienti la proliferazione in vitro dei linfociti CD4+ e la produzione di IL17 correla perfettamente con l'attività di malattia valutata attraverso risonanza magnetica (34).

Un accenno va fatto anche alle popolazioni residenti nel sistema nervoso centrale, quali monociti, microglia e astrociti, cui si deve il rilascio di citochine che promuovono il differenziamento o l'attivazione delle cellule linfocitarie che hanno infiltrato la barriera emato-encefalica. È stato ad esempio osservato come cellule dendritiche mieloidi ottenute da prelievi di pazienti affetti da sclerosi multipla rilascino quantità di IL23 maggiori rispetto al controllo, cosa che le rende potenzialmente più abili nel promuovere la differenziazione di cellule CD4 naive in TH17 (35). Questa ed altre evidenze fanno supporre che l'induzione dei linfociti TH17 avvenga direttamente a livello tissutale, e che essi possano derivare dai linfociti TH1 stessi, esposti ad una successiva stimolazione antigene-specifica.



**Tav. 3:** pathways di differenziamento linfocitario



## Capitolo IV

### 4.1. Meccanismi di regolazione immunitaria e cellule T regolatorie

#### 4.1.1. La regolazione immunitaria nel sano

Accanto alla risposta immunitaria propriamente detta, che protegge l'organismo dall'attacco di agenti potenzialmente nocivi, stanno meccanismi di regolazione immunologica che intervengono spegnendo l'infiammazione laddove essa non sia più necessaria e modulando la risposta al self al fine di prevenire reazioni autoimmuni.

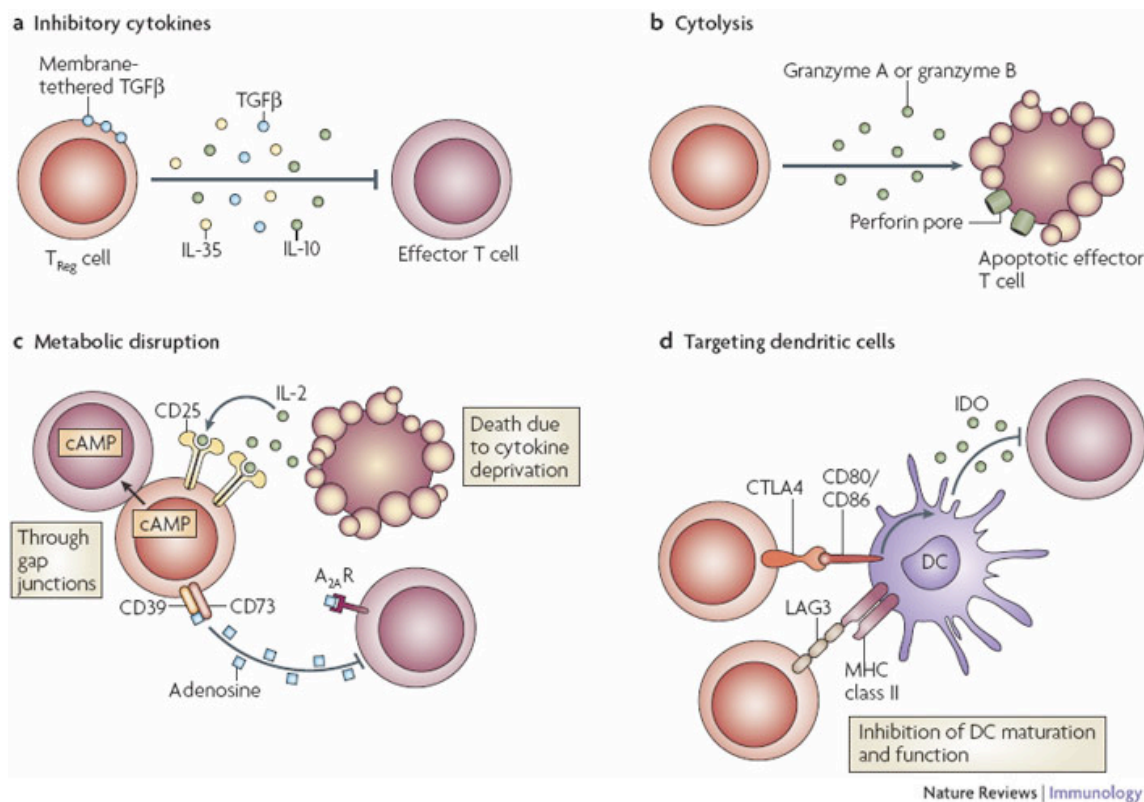
Le popolazioni cellulari coinvolte in quest'azione regolatoria sono molteplici. È possibile riscontrare una prima modulazione della risposta immunitaria già a livello della risposta innata, ed in particolare nell'azione svolta da cellule NK che esprimono recettori di tipo inibitorio. Un ruolo primario in questo senso è poi svolto dall'ambiente citochinico in cui le popolazioni linfocitarie effettrici vengono a trovarsi, ambiente essenzialmente creato dalle popolazioni adibite alla presentazione antigenica. Cellule APC quali cellule dendritiche, linfociti B e macrofagi, una volta stimolate in seguito ad un processo infiammatorio di cui sia necessario lo spegnimento, secernono citochine che condizionano il differenziamento linfocitario in senso protettivo; in seguito ad attivazione queste cellule rilasciano infatti IL4 e TGF $\beta$ , che condizionano i linfociti bersaglio polarizzandoli rispettivamente in cellule Th2 e in cellule regolatorie. Sono proprio quest'ultime che nell'uomo sono oggi oggetto di grande attenzione, data l'importanza che alterazioni a loro carico assumono nello sviluppo delle patologie autoimmuni. Le cellule regolatorie umane sono identificate per via dell'espressione

ad alti livelli del recettore per l'interleuchina 2 (CD25). IL CD25 è però anche un marcatore di attivazione dei linfociti e ciò ne limita in modo significativo l'utilizzo come biomarker dei linfociti regolatori. Sakaguchi e colleghi hanno recentemente scovato un fattore di trascrizione, il Foxp3, che identifica in modo specifico la popolazione di linfociti T regolatori nell'uomo. La sua funzione è essenziale per lo sviluppo e la funzionalità di questo subset cellulare e mutazioni a carico della sua sequenza comportano lo sviluppo di disordini immunologici a carattere linfoproliferativo tanto nel modello murino quanto nell'uomo (71, 72, 73, 74).

I numerosi studi effettuati in questo ambito hanno permesso di approfondire la caratterizzazione fenotipica e funzionale dei linfociti Treg nell'uomo. Da questi studi è recentemente emerso il fatto che i linfociti T CD4+CD25<sup>high</sup>, dotati di capacità soppressiva, siano caratterizzati dall'espressione nulla o a bassi livelli del marker di attivazione CD127 e della molecola di adesione CD49d; Kleinewietfeld e colleghi hanno recentemente messo a punto una metodica di isolamento che sfrutta proprio l'espressione di questi marcatori al fine di ottenere in vitro una popolazione di linfociti T regolatori "untouched" altamente purificata (60, 75).

Anche la conoscenza dei meccanismi funzionali di soppressione delle Tregs è ad oggi piuttosto approfondita, sebbene non ancora esaustiva. L'ipotesi maggiormente accreditata suggerisce che il blocco della proliferazione dei linfociti T responder sia dovuto all'interazione di molteplici meccanismi: studi in vitro hanno innanzitutto dimostrato come la soppressione necessiti del contatto cellula-cellula, sebbene non sia stata ancora chiarita la natura di tale interazione. Pandiyan e colleghi hanno poi recentemente suggerito la possibilità che l'azione delle cellule regolatorie si espleti nella capacità di questi linfociti di sottrarre citochine indispensabili alla sopravvivenza delle loro cellule bersaglio (76). Nel periodo appena trascorso si è fatta strada la possibilità che i nucleotidi e loro derivati possano svolgere un ruolo importante nei meccanismi di soppressione della

popolazione Treg. Bopp e colleghi hanno visto nell'AMP ciclico sintetizzato dai linfociti CD4+CD25highFoxp3+, un possibile fattore regolatorio: questa molecola verrebbe infatti iniettata dai linfociti soppressori alla popolazione responder attraverso gap junction, e ciò permetterebbe poi all'AMP ciclico di espletare la propria azione immunomodulante sulle cellule effettrici bersaglio (80). In questo ambito si colloca anche il presente lavoro, che attribuisce alla ectonucleotidasi CD39, espressa sulla superficie dei linfociti CD4+CD25high, un ruolo immunoregolatore. Il CD39, in collaborazione con altri ectoenzimi, è in grado di scindere l'ATP extracellulare, e potrebbe in tal modo bloccare l'azione pro-infiammatoria svolta da questo nucleotide a carico di linfociti effettrici e cellule dendritiche, e condurre inoltre alla produzione di adenosina, cui si riconoscono proprietà anti-infiammatorie (48).



**Tav. 4:** potenziali meccanismi di soppressione utilizzati dalla popolazione di linfociti T regolatori

#### **4.1.2. Le cellule CD4 T regolatorie nella sclerosi multipla**

I linfociti T regolatori CD4+CD25<sup>high</sup> rappresentano la popolazione cui viene riconosciuto il ruolo principale nel mantenimento della tolleranza immunologica. La deplezione di questi linfociti comporta l'instaurarsi di disordini immunologici nel modello murino e molteplici patologie autoimmuni sono legate nell'uomo a difetti nella loro frequenza o funzione. (40, 41, 42.)

La patogenesi della sclerosi multipla è strettamente connessa alla rottura dell'equilibrio esistente tra popolazioni cellulari tollerogeniche e cellule auto-reattive sfuggite alla selezione timica. Molteplici studi hanno messo in luce il legame esistente tra disfunzioni a carico del reparto T regolatorio e suscettibilità a sviluppare la malattia. I risultati riguardanti tali possibili disfunzioni sono però piuttosto controversi, cosa che probabilmente va attribuita alla mancanza di un marker che definisca in modo specifico la popolazione CD4 regolatoria. Dati ottenuti recentemente suggeriscono che le alterazioni a carico della popolazione regolatoria tra sani e pazienti possano essere messe in luce in modo più veritiero focalizzando l'attenzione sulla composizione della frazione CD25<sup>high</sup>.

Molti gruppi hanno dimostrato in passato come la frequenza della popolazione CD4+CD25<sup>high</sup> nel sangue periferico di pazienti affetti da sclerosi multipla sia uguale a quella dei donatori sani (43, 44, 45). Allo stesso tempo lo studio di questo subset cellulare aveva portato a supporre l'esistenza di un'alterazione funzionale della popolazione regolatoria nei pazienti stessi (44). In realtà un'analisi più approfondita del fenotipo dei linfociti regolatori ha permesso di individuare la presenza di molteplici sottopopolazioni, distinte per caratteristiche fenotipiche e funzionali, comprese nell'ambito della frazione CD25<sup>high</sup>. Restringendo l'attenzione ai linfociti Foxp3 positivi, ad esempio, Huan e colleghi hanno per primi osservato la riduzione della frequenza di questa sottopopolazione linfocitaria,

e dei livelli di RNA messaggero del fattore di trascrizione, nei pazienti affetti da sclerosi multipla; questi dati sono stati successivamente comprovati da Venken e colleghi, che hanno però riscontrato una normalizzazione dei valori osservati nella fase secondaria - progressiva della malattia (46, 47). Allo stesso modo l'utilizzo del Foxp3 ha permesso di mettere in luce una ridotta frequenza di cellule T regolatorie nel liquor di pazienti, cosa che l'osservazione del subset CD25<sup>high</sup> nel suo complesso non aveva permesso di monitorare (59).

Sempre in questo ambito l'utilizzo del CD127 -un marcatore di attivazione cellulare down-regolato dalle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> nell'uomo- ha permesso a Laplaud e colleghi di escludere la popolazione T potenzialmente attivata dal subset regolatorio CD25<sup>high</sup>; la sottopopolazione di linfociti T regolatori così ottenuta non manifesta una funzionalità alterata nei pazienti affetti da sclerosi multipla, tanto da essersi dimostrata capace di inibire la proliferazione e il rilascio di citochine da parte della popolazione responder in modo paritario rispetto alle cellule regolatorie ottenute da donatori sani (60). In questo ambito si colloca infine il presente studio, che ha permesso di individuare nei pazienti un'alterata frequenza di cellule regolatorie caratterizzate dall'espressione del marker CD39 (48).

Un ultimo parametro, da tenere in considerazione al fine di valutare eventuali differenze tra il subset regolatorio del sano e quello del malato, è infine rappresentato dallo stadio di progressione della sclerosi multipla nei pazienti presi in esame: Stinissen e colleghi hanno infatti recentemente osservato una diversa composizione di cellule regolatorie naive e cellule regolatorie memory nello stadio precoce della patologia rispetto allo stadio cronico, nonché un'alterazione della capacità soppressoria di queste popolazioni cellulari in correlazione allo stadio stesso (61).

# Capitolo V

## 5.1. I nucleotidi extracellulari e il CD39

### 5.1.1. I nucleotidi extracellulari

I nucleotidi pirinici e pirimidinici sono molecole costituite da una base eterociclica rispettivamente appartenente alla famiglia delle purine e a quella delle pirimidine, da uno zucchero e da uno a tre gruppi fosfato. Sono molecole solubili in acqua e facilmente idrolizzabili da soluzioni acquose di acidi. In particolare nei fluidi extracellulari i nucleotidi divengono bersaglio, con modalità che differiscono tra le diverse molecole, dell'attività enzimatica delle ecto-apirasi, delle ecto-ATPasi e delle ecto-5'nucleosidasi preposti alla loro degradazione.

I nucleotidi vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare in seguito a lisi cellulare o a permeabilizzazione della membrana plasmatica; possono inoltre essere rilasciati da alcuni isotipi cellulari (macrofagi, cellule della microglia, linfociti T citotossici, piastrine, cellule endoteliali e neuroni) in seguito a stimoli specifici.

Da tempo ne è nota l'importanza in quanto unità strutturali degli acidi nucleici, come costituenti di coenzimi ed intermedi di reazioni sintetiche, nonché per il ruolo svolto in molteplici attività cellulari inerenti il metabolismo energetico e la segnalazione intracellulare. Molte sono però ancora oggi le funzioni biologiche svolte da queste molecole che rimangono da comprendere.

Nel 1929 Druri e Szent-Gyorgi, descrissero l'azione bradicardica e vasodilatatrice dei nucleotidi extracellulari; i loro studi aprirono la strada all'ipotesi che i

nucleotidi purinici e pirimidinici interpretassero un ruolo da protagonisti in molti processi cellulari e fisiologici.

Da principio l'interesse si concentrò sull'azione esercitata dai nucleotidi a livello del sistema muscolare e nervoso, nella convinzione che queste molecole svolgessero un ruolo prominente solo nell'ambito dei tessuti eccitabili. Studi successivi hanno in realtà messo in luce la capacità dei nucleotidi extracellulari di agire su un'ampia gamma di tessuti e di regolare un eterogeneo insieme di risposte biologiche quali proliferazione, differenziamento, chemiotassi e rilascio di citochine, secrezione di fattori lisosomiali e formazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, nonché induzione di morte cellulare per necrosi ed apoptosi.

### **5.1.2. La famiglia dei recettori P2**

Le informazioni oggi disponibili circa l'azione esplicata dai nucleotidi nell'ambito di molteplici compartimenti cellulari e riguardo eterogenee funzioni biologiche portano a raffigurare ATP ed UTP come potenziali messaggeri extracellulari. È infatti nota la capacità condivisa da diversi isotipi cellulari di secernere ATP ed UTP in modo controllato; inoltre la presenza di specifici enzimi degradativi nei fluidi extracellulari contribuisce a regolare finemente la concentrazione dei nucleotidi e permette di terminarne l'attività.

L'ipotesi che ATP ed UTP svolgano un ruolo come messaggeri è ulteriormente accreditata dalla presenza di recettori di membrana preposti al legame con i nucleotidi. I primi elementi della famiglia recettoriale P2 furono descritti da Burnstock nel 1978 (62). Ad oggi sono stati clonati e caratterizzati diversi sottotipi recettoriali, responsabili, nei mammiferi, della risposta alla stimolazione da parte dei nucleotidi extracellulari.

Questi sottotipi vengono raggruppati in un'unica famiglia, quella dei recettori P2. La classificazione oggi utilizzata si basa sull'esame delle caratteristiche molecolari; essa ha soppiantato la precedente fondata su criteri farmacologici e funzionali: Questa classificazione distingue la famiglia dei recettori P2 in due categorie: quella dei recettori P2Y, accoppiati a G-protein, e quella dei recettori P2X a canale ionico. (63, 64, 65).

L'espressione di molteplici recettori appartenenti alla famiglia P2 sulla superficie dei linfociti umani è già stata attestata, sebbene studi più approfonditi su sottopopolazioni linfocitarie debbano ancora essere effettuati.

### **5.1.3. Effetti dell'ATP e dell'adenosina sulla popolazione linfocitaria**

L'esistenza di un'azione esplicata dai nucleotidi extracellulari sui linfociti umani è nota fin dal 1978, anno in cui Gregory e Kern dimostrarono la capacità dell'ATP di stimolare la proliferazione linfocitaria nell'uomo (58).

L'effetto mediato da questo nucleotide sulla popolazione linfocitaria è variabile e dipende strettamente dal recettore bersaglio.

Alla stimolazione del recettore P2X<sub>7</sub> ad esempio segue un effetto citotossico, che varia notevolmente a seconda dello stadio differenziativo delle cellule target della filiera linfoide; i timociti CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TCR<sup>high</sup> sembrano essere l'istotipo maggiormente suscettibile alla lisi cellulare mediata da ATP (59).

Tanto l'ATP che l'UTP inducono rilascio di Ca<sup>2+</sup> dai compartimenti intracellulari dei linfociti umani, in seguito a stimolazione dei recettori specifici. Inoltre l'esposizione ai nucleotidi extracellulari media l'*up regulation* della molecola di adesione L-selectina e del recettore a bassa affinità per le IgE nelle leucemie croniche linfoproliferative a cellule B (60).



Linfociti T esposti ad ATP in vitro sono soggetti a proliferazione e up-regolazione dei marcatori attivatori quali CD25 e CD69 e Atarashi e colleghi hanno recentemente dimostrato che il nucleotide induce la differenziazione di linfociti Th17 della lamina propria (66).

L'azione dell'ATP sui linfociti effettori potrebbe essere inoltre legata al coinvolgimento indiretto di cellule APC; l'ATP induce infatti rilascio di IL1beta da parte dei monociti ed ancora maturazione e chemiotassi di cellule dendritiche mieloidi differenziate in vitro (67, 68).

Gli effetti pro-infiammatori dell'ATP sono controbilanciati nell'ambiente extracellulare, da quelli di un suo derivato, l'adenosina. L'interazione dell'adenosina con il recettore A2a inibisce infatti l'attivazione linfocitaria, e ancora blocca la differenziazione di linfociti CD4 naive in cellule Th1 e Th2 (69, 70).

#### **5.1.4. L'ectonucleotidasi CD39**

Il recettore CD39 appartiene alla famiglia delle ectonucleotidasi trifosfato difosfoidrolasi (E-NTPDase), un gruppo di enzimi dall'espressione ubiquitaria adibiti al controllo della concentrazione extracellulare di nucleotidi trifosfato, che degradano gli NTPs in nucleotidi monofosfato.

Il CD39 è l'apirasi maggiormente rappresentata nel sistema immunitario, ed è espressa da neutrofili, linfociti B, dendritiche e sottopopolazioni di linfociti T. L'azione del CD39 nell'ambito della risposta immunitaria non è stata ancora compresa in modo esaustivo; il suo ruolo prominente è quello di scindere l'ATP per dar luogo ad AMP o ADP, cosa che gli conferisce un'azione immunomodulatoria per via dei marcati effetti pro-infiammatori dell'ATP stesso. Allo stesso tempo l'attività del CD39 in concomitanza con quella del CD73

potrebbe condurre alla sintesi di adenosina, una molecola dalle spiccate proprietà anti-infiammatorie.

A conferma della funzione ATPasica del CD39 in ambito immunologico, Koziac e colleghi hanno osservato una correlazione tra i livelli di espressione dell'ectonucleotidasi sulla superficie di linfociti NK e l'attività ectonucleotidasica cellulare stessa. Il CD39 potrebbe inoltre svolgere un ruolo extra-enzimatico, inizializzando una via di signaling intracellulare coinvolta nell'attivazione linfocitaria. Studi sul modello murino hanno poi permesso di osservare come il topo CD39-null sviluppi una marcata alopecia di natura autoimmune, risultati che suggeriscono un possibile ruolo dell'enzima in ambito immunoregolatorio. Borsellino e colleghi, in concomitanza con Deaglio e colleghi, hanno indicato il CD39 come effettivo biomarker della popolazione di linfociti T regolatori nell'uomo, e hanno suggerito la possibilità che questo enzima partecipi attivamente al meccanismo di soppressione mediato dai linfociti CD4+CD25high.

## 5.2. Sintesi dello studio

La sclerosi multipla è una patologia infiammatoria, a carattere autoimmune, che colpisce il sistema nervoso centrale. Il processo infiammatorio che si instaura a carico del SNC nel corso della malattia è condotto da popolazioni cellulari autoreattive ed è responsabile della formazione di placche di demielinizzazione che sfociano nel tempo in un processo neurodegenerativo. Alterazioni a carico dei sistemi di regolazione della risposta immune sono presumibilmente coinvolti nello sviluppo della malattia. Molteplici studi hanno riscontrato una diminuzione della frequenza delle cellule T regolatorie CD4+ nei pazienti affetti da sclerosi multipla, nonché alterazioni a livello funzionale di questa frazione linfocitaria.

Il presente studio si è proposto come primo obiettivo quello di contribuire alla caratterizzazione fenotipica e funzionale della popolazione di linfociti T regolatori CD4+CD25high nel sano, al fine di trovare marcatori e caratteristiche che ne permettessero una selezione specifica. In secondo luogo l'analisi effettuata su donatori sani è stata estesa ai pazienti affetti da sclerosi multipla, con lo scopo di scovare nel malato eventuali alterazioni a carico della popolazione monitorata.

I risultati ottenuti hanno permesso di individuare nell'ambito dei linfociti CD4+CD25high, una sottopopolazione regolatoria che si caratterizza per l'espressione del marcatore CD39. Questa sottopopolazione è l'unica dotata di una reale capacità soppressoria ed il CD39 appare direttamente coinvolto, in quanto ectonucleotidasi, nel meccanismo di regolazione. La Popolazione CD4+CD25highCD39+ appare infatti dotata di capacità ATPasica, attraverso la quale potrebbe spegnere l'azione pro-infiammatoria svolta dall'ATP su linfociti e cellule dendritiche bersaglio. La scissione dell'ATP conduce inoltre a formazione di adenosina, molecola dotata di proprietà immunomodulanti.

L'analisi citofluorimetrica messa a punto ha poi permesso di riscontrare la presenza di sottopopolazioni Th1 e Th17 recentemente attivate nell'ambito della frazione CD4+CD25high. Queste popolazioni effettrici sono confinate nel subset linfocitario CD39 negativo. Ciò conferma la possibilità di utilizzare il CD39 allo scopo di isolare in modo specifico la popolazione di linfociti T regolatori nell'uomo.

Un'ulteriore analisi citofluorimetrica è stata in fine applicata al fine di valutare la frequenza della popolazione CD4+CD25highCD39+ nel sangue periferico. Questa analisi ha messo in luce una diminuzione significativa della popolazione CD4+CD25highCD39+ nei pazienti affetti dalla forma recidivante-remittente della sclerosi multipla; tale frequenza risulta ripristinata nei soggetti sottoposti a trattamento con interferon  $\beta$ .

Lo studio dei pazienti in fase acuta di malattia, ha invece permesso di osservare la presenza di uno stato di attivazione generale del sistema immunitario nel corso delle ricadute: tanto la popolazione regolatoria che le popolazioni effettrici recentemente attivate Th1 e Th17 subiscono un'espansione nel soggetto malato rispetto al donatore sano.

I dati ottenuti suggeriscono che un'alterazione della frequenza dei linfociti regolatori possa essere coinvolta nell'esordio della sclerosi multipla. Si può poi supporre che sia la popolazione effettrice autoreattiva che quella regolatoria subiscano un'attivazione nei pazienti in corso di ricadute; questa espansione non ripristina però l'equilibrio tra cellule regolatorie e cellule effettrici che controlla la risposta infiammatoria nel sano. La presenza di un numero insufficiente di linfociti regolatori contribuirebbe quindi in questo senso ad alimentare la risposta autoimmune.

## Capitolo VI

### 6.1. Materiali e metodi

#### 6.1.1. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 38 pazienti affetti da sclerosi multipla nella forma recidivante - remittente (12 uomini e 26 donne di età pari a  $36.3 \pm 8.2$  anni), di cui 12 in fase attiva di malattia e 74 donatori sani senza esperienze precedenti di malattie neurologiche (23 uomini e 51 donne di età pari a  $35.2 \pm 11.3$  anni). I pazienti di cui sopra non hanno ricevuto trattamento farmacologico nei 3 mesi precedenti il coinvolgimento nello studio. In una fase successiva sono stati arruolati 12 pazienti (3 uomini e 9 donne di età compresa tra  $36.7 \pm 7$  anni) che sono stati seguiti per 12 mesi di trattamento con interferon  $\beta$ . Tutti i pazienti arruolati presentavano uno stato di disabilità  $\leq 4$  nella scala dell'EDSS: Lo studio è stato condotto con l'approvazione del comitato etico della Fondazione Santa Lucia di Roma e consenso informato scritto ottenuto dai partecipanti in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

#### 6.1.2. Anticorpi e reagenti

Nella fase sperimentale sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: hCD3 (HT3a), hCD4 (RPA-T4), hCD25 (2°3), hCD45RO (UCHL1), hCCR6 (11A9), hCD49d (9F10) prodotti dalla BD Biosciences, San Jose, CA.; hCD39 (TU66) prodotto dalla AbD SEROTEC, UK; hFoxp3 (PCH101) prodotto dalla eBioscience.

L'ATP è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

### **6.1.3. Separazione cellulare e marcatura di superficie**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di densità (Ficoll-hypaque). Il sangue eparinizzato prelevato dai donatori è stato diluito 1:1 con terreno di coltura RPMI 1640 (GIBCO) e stratificato lentamente su Ficoll-Hypaque (Pharmacia); dopo centrifugazione per 30 minuti a 660 g, le cellule mononucleate sono state raccolte dall'interfaccia del gradiente e lavate tre volte in RPMI e centrifugate a 430 g per 10 minuti. Le cellule sono state risospese in soluzione salina (Phosphate Buffer Saline, PBS) addizionata con 2% siero umano. Per ogni marcatura sono state utilizzate  $0.5 \times 10^6$  cellule risospese in un volume di 100  $\mu$ l. Gli anticorpi monoclonali coniugati con un fluorocromo sono stati aggiunti e i campioni incubati per 20 minuti in ghiaccio al buio. I campioni sono stati lavati due volte con PBS, risospesi in 250  $\mu$ l di PBS, e analizzati al citofluorimetro (FACSCanto, Beckton e Dickinson).

### **6.1.4. Marcatura intracellulare**

Le cellule mononucleate, precedentemente marcate in superficie, sono state risospese in formaldeide al 4% e incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo lavaggio in PBS, le cellule fissate sono state risospese in saponina allo 0.05% addizionata degli anticorpi di interesse. I campioni sono stati così incubati a temperatura ambiente per 15 minuti, dunque lavati in saponina allo 0.01% ed infine risospesi in 250  $\mu$ l di PBS

### **6.1.5. Analisi citofluorimetrica**

L'analisi dei campioni è stata effettuata su citofluorimetro FACSCanto (Beckton e Dickinson). Per ogni campione sono stati selezionati circa 300.000 linfociti in base a criteri di dimensione (FSC) e granulosità (SSC). I dati sono stati analizzati mediante software FloJo (Treestar).

La separazione di sottopopolazioni cellulari è stata effettuata attraverso il sorter MoFlo (Beckton e Dickinson).

### **6.1.6. Microscopia confocale**

Linfociti umani CD25+ sono stati isolati dal sangue periferico di donatori sani attraverso il kit di separazione Miltenyi. Le cellule ottenute sono state marcate con un anticorpo purificato anti CD39 e con un anticorpo secondario coniugato al fluoro cromo Alexa488. I linfociti così trattati sono stati dunque sottoposti a marcatura intracellulare con l'anticorpo anti-Foxp3 coniugato con fluorocromo APC. I nuclei sono stati resi riconoscibili dalla marcatura effettuata con DAPI. I campioni ottenuti sono stati osservati al microscopio confocale Zeiss LSM510 (Oberlochen, Germany).

### **6.1.7. Separazione immunomagnetica**

Linfociti T CD4+CD25- e cellule presentanti l'antigene CD3- sono state isolate dalla frazione di cellule mononucleate attraverso l'utilizzo del sistema di separazione Mylteni. (Miltenyi Biotec; Bergish Gladblach, Germany). Tale sistema utilizza colonne immunomagnetiche che consentono recuperi fino all'85% e un

livello di purificazione intorno al 95%. Le PBMC ottenute da donatore sono state dunque marcate in Running con beads magnetiche coniugate ad anticorpi anti CD3 o anti CD4 e anti CD25, a seconda della separazione effettuata. I campioni così trattati sono stati sottoposti a deplezione, al fine di ottenere popolazioni purificate *untouched*.

#### **6.1.8. Saggio di soppressione**

Il saggio di soppressione in vitro è stato messo a punto utilizzando piastre sterili da 96 pozzetti a V, nelle quali sono state piastrate  $2.5 \times 10^4$  linfociti CD4+CD25- e  $50 \times 10^4$  APC CD3- sottoposte ad irraggiamento. Ad ogni pozzetto è stata poi aggiunta una quantità variabile, a seconda delle condizioni, di linfociti CD4+CD39+ e CD4+CD39- sortati. La stimolazione è stata effettuata per mezzo dell'anticorpo aCD3 (T3D) alla concentrazione di 10ug/ml. Dopo 72 ore di incubazione a 37°C è stata aggiunta ad ogni pozzetto una quantità pari a 0.037MBq/well ( $1\mu\text{Ci}$ /pozzetto) di timidina radioattiva ( $^3\text{H}$ ). Dopo 12 ore la proliferazione cellulare è stata testata attraverso un apposito lettore di piastra (Wallas, Gaithesburg, MD).

#### **6.1.9. Saggio di idrolisi dell'ATP**

Linfociti CD4+CD25high ottenuti da differenti donatori sani e da pazienti MS sono stati incubati in piastre sterili da 96 pozzetti, ciascuno contenente ATP alla concentrazione di 50uM. La scissione dell'ATP è stata valutata utilizzando il kit CellTiter-Gio Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) e i risultati ottenuti sono stati osservati attraverso il lettore di piastra Wallac Victor V.





## Capitolo VII

### 7.1. Risultati

#### 7.1.1. Il CD39 è espresso costitutivamente da una sottopopolazione CD4+CD25<sup>high</sup> Foxp3 positiva

Le cellule regolatorie CD4 positive sono identificate nell'uomo da un marker di attivazione linfocitaria, il recettore per l'interleuchina 2 (CD25) e dall'espressione costitutiva del fattore di trascrizione Foxp3. Al fine di individuare un marcatore di superficie che permettesse di caratterizzare con maggiore specificità il subset regolatorio T CD4 nell'uomo, PBMC ottenute da donatori sani sono state marcate con anticorpi coniugati a fluorocromi e di seguito analizzate per via citofluorimetrica. L'analisi così messa a punto ha permesso di individuare l'espressione dell'ectonucleotidasi CD39 sulla superficie di una sottopopolazione CD4+CD25<sup>high</sup>. Il 3% circa della popolazione CD4 positiva nel sano esprime il CD39 (Figura 1A) e la quasi totalità delle cellule CD4+CD39<sup>+</sup> è confinata proprio nella frazione CD25<sup>high</sup>. È possibile riscontrare la presenza di una percentuale trascurabile di linfociti CD39 positivi anche nei linfociti attivati che esprimono il recettore per l'interleuchina 2 a bassi livelli, mentre questa ectonucleotidasi non risulta espressa nei linfociti naive CD25 negativi (Figura 1B).

### **7.1.2. L'espressione del CD39 correla con quella dei principali marcatori regolatori**

Una successiva analisi citofluorimetrica è stata applicata più nel dettaglio al subset CD25<sup>high</sup>, al fine di valutare la correlazione del CD39 con quei marker che ad oggi vengono considerati importanti per la caratterizzazione delle cellule T regolatorie. I risultati così ottenuti hanno messo in luce come i linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> positivi risultino confinati nella frazione Foxp3 positiva (Figura 2A). In aggiunta a ciò l'intensità media di fluorescenza dell'ectonucleotidasi correla linearmente con quella del fattore di trascrizione regolatorio, così che maggiore è l'espressione del CD39 sulla popolazione presa in considerazione, maggiore risulta essere l'espressione del Foxp3. Questi dati sono stati confermati da analisi effettuate in microscopia confocale (Figura 2B e 2C).

Bluestone e colleghi hanno recentemente riscontrato la down-regolazione del marcatore CD127 sulla superficie della frazione regolatoria CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> (77); in aggiunta a ciò le cellule regolatorie esprimono solo bassi livelli della molecola di adesione CD49d, tanto che l'utilizzo di questi due marcatori ci ha permesso di mettere a punto una metodica di isolamento di cellule regolatorie *untouched* altamente arricchite (75). L'espressione del CD39 sulla popolazione CD25<sup>high</sup> correla inversamente con quella del CD127 e del CD49d e ciò permette ancor più di considerare il CD39 come reale biomarker dei linfociti T regolatori nell'uomo (Figura 2D).

### **7.1.3. Il CD39 individua una sottopopolazione di linfociti T regolatori dalle caratteristiche memory**

Borsellino e colleghi hanno precedentemente mostrato come l'espressione del CCR6 identifichi l'esistenza di una sottopopolazione memory nel contesto della frazione CD4 regolatoria nell'uomo (78). Nello stesso anno uno studio di Valmori e colleghi ha permesso di osservare la presenza di cellule regolatorie naive CD45RA+ nel sangue periferico e negli organi linfoidi di individui sani. L'importanza della distinzione tra cellule regolatorie naive e memory è stata sottolineata da un recente studio attraverso cui Stinnisen e colleghi hanno osservato che queste due popolazioni ricoprono effettivamente ruoli diversi nel contesto autoimmune (11).

La popolazione regolatoria CD4+CD25highCD39+ è stata dunque testata per l'espressione del marcatore CD45RO e l'analisi ottenuta ha rivelato che la popolazione CD39 è essenzialmente confinata nel subset CD45RO+. Una buona percentuale di linfociti regolatori CD4+CD25highCD39+ esprime inoltre alti livelli di CCR6, confermando quindi di possedere un fenotipo *memory* (Figura 3). Nonostante ciò, l'analisi dell'espressione del CD49d, una molecola di adesione espressa dai linfociti attivati, ha rivelato una differenza interessante tra le cellule regolatorie e quelle effettrici memoria: la popolazione CD4+CD25highCD39+, infatti, esprime il CD49d soltanto a bassi livelli.

### **7.1.4. La capacità soppressoria delle cellule CD4 T regolatorie è confinata nella frazione CD39 positiva**

L'osservazione che l'espressione del CD39 identifica due sottopopolazioni distinte nel contesto del subset CD25high ha suggerito la possibilità che questa distinzione

potesse essere valida anche dal punto di vista funzionale. PBMC ottenute da donatori sani sono dunque state sortate in base all'espressione dell'ectonucleotidasi e la capacità regolatoria delle popolazioni CD4+CD25highCD39+ e CD4+CD25highCD39- così ottenute è stata testata in vitro mediante un assay di soppressione di linfociti T responder attivati. Dai risultati ottenuti è emerso come la capacità soppressoria espressa dalla frazione CD25high sia confinata esclusivamente nella popolazione CD39 positiva (Figura 4). Ciò conferma che l'espressione dell'ectonucleotidasi definisce due sottopopolazioni linfocitarie differenti e sottolinea il ruolo di effettivo biomarker del CD39. L'importanza dei dati ottenuti è inoltre legata al fatto che essi implicano l'esistenza di una frazione Foxp3+ -ma CD39+- cui di fatto non è conferita una capacità soppressoria.

#### **7.1.5. La frequenza dei linfociti regolatori CD4+CD25highCD39+ è diminuita nei pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente**

Come già sottolineato precedentemente, i risultati ottenuti circa possibili alterazioni della popolazione di linfociti T regolatori nei pazienti affetti da sclerosi multipla sono piuttosto controversi. Studi recenti, tra cui si inserisce il presente, hanno però messo in luce l'esistenza di marker che definiscono i linfociti regolatori in modo sempre più accurato, e ciò ci consente oggi di ottenere dati più veritieri circa il ruolo svolto da questi linfociti nel contesto autoimmune.

Poiché il CD39 si è rivelato capace di individuare la popolazione CD4 caratterizzata da attività soppressoria, PBMC ottenute da pazienti affetti da sclerosi multipla sono state testate al fine di valutare la frequenza della sottopopolazione CD4+CD25highCD39+; i dati così ottenuti sono stati messi a confronto con quelli relativi a donatori sani. L'analisi citofluorimetrica è stata applicata a campioni provenienti da 74 donatori sani e da 26 pazienti nella fase recidivante - remittente

della malattia, ed ha messo in luce una significativa diminuzione della frequenza media di linfociti regolatori CD39+ nel sangue dei pazienti rispetto ai donatori sani ( $p < 0.001$ ). Tale frequenza si assesta intorno al 35% nel sano e diviene pari al 24% nel malato (Figura 5B). Dati preliminari relativi a PBMC provenienti da pazienti in fase acuta di malattia, hanno poi rivelato un'espansione della frazione CD4+CD25highCD39+. Questi dati non sorprendono in quanto probabilmente frutto dello stato di attivazione che coinvolge il sistema immunitario nel suo insieme, nel corso delle relapses; resta comunque da capire quanto l'espansione osservata sia dovuta ad un aumento di numero della popolazione linfocitaria regolatoria vera e propria, e non sia invece il frutto di un'up-regolazione del CD39 sulla superficie di linfociti T effettori attivati.

Infine, a conferma dei dati presenti in letteratura, la frequenza della popolazione CD4+CD25high nel suo complesso è risultata invariata nei pazienti rispetto ai donatori (Figura 5A).

#### **7.1.6. La frequenza della popolazione CD4+CD25highCD39+ risulta aumentata nei pazienti in corso di trattamento con interferon beta**

I farmaci normalmente utilizzati per il trattamento della sclerosi multipla sono rappresentati per lo più da sostanze immunomodulatorie, il cui ruolo è principalmente quello di spegnere la risposta infiammatoria e il processo neurodegenerativo che ne deriva, al fine di limitare i sintomi e la progressione della malattia. L'interferon beta appartiene a questa categoria farmaceutica; il suo utilizzo riduce significativamente il numero delle ricadute nei pazienti affetti dalla forma recidivante-remittente della sclerosi multipla. Allo scopo di valutare eventuali effetti del farmaco somministrato, sulla popolazione CD4 regolatoria, la frequenza dei linfociti CD4+CD25highCD39+ è stata monitorata su PBMC

ottenute da 12 pazienti. L'analisi è stata effettuata prima e dopo trattamento con interferon beta. I dati ottenuti confermano la diminuzione della popolazione soppressoria nel periferico dei pazienti non sottoposti a trattamento, ma mostrano anche un aumento di tale frequenza a tre mesi dall'inizio della somministrazione di interferon beta (Figura 6A e 6B). Analisi effettuate in un arco di tempo più lungo, suggeriscono inoltre che la frequenza dei linfociti CD4+CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> tenda ad incrementare nel tempo, fino a stabilirsi, al dodicesimo mese di trattamento, sui livelli che caratterizzano gli individui sani (Figura 6C).

#### **7.1.7. Il CD39 conferisce ai linfociti regolatori un'attività ATPasica che appare mantenuta nei pazienti MS**

I dati fin qui ottenuti dimostrano quindi che il CD39 definisce due sottopopolazioni linfocitarie distinte fenotipicamente e funzionalmente, e cosa ancora più importante, il fatto che l'ectonucleotidasi identifica proprio la popolazione potenzialmente soppressoria. Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che il CD39, in quanto apirasi, possa essere attivamente coinvolto nella attività soppressoria dei linfociti da cui è espresso.

Partendo da questa ipotesi è stato dunque messo a punto un *assay* in vitro che permettesse di monitorare l'attività ATPasica dei linfociti CD39 positivi. PBMC ottenute da donatori sani sono state quindi sortate in base all'espressione del CD39, e le popolazioni CD4+CD39<sup>+</sup> e CD4+CD39<sup>-</sup> così ottenute sono state testate per la capacità di scindere ATP in vitro. Queste popolazioni hanno mostrato di possedere una attività ATPasica; inoltre i dati ottenuti permettono di assumere che tale attività dipenda strettamente dal CD39 stesso, in quanto la concentrazione di ATP scisso è direttamente proporzionale ai livelli dell'ectonucleotidasi espressi dalle popolazioni cellulari prese in considerazione (Figura 7A e 7B).

I test funzionali così messi a punto su donatori sani, sono stati poi estesi a PBMC ottenute da pazienti affetti da sclerosi multipla. I risultati preliminari ottenuti dimostrano che il CD39 conferisce un'attività ATPasica anche a tali popolazioni linfocitarie, e suggeriscono che l'attività funzionale dell'ectonucleotidasi sia mantenuta nel malato (Figura 7C). Queste analisi funzionali dovranno tuttavia essere estese ad un più ampio numero di pazienti.

#### **7.1.18. Il CD39 permette di discriminare tra linfociti regolatori e linfociti effettori recentemente attivati**

Il CD39 identifica dunque la popolazione linfocitaria che nel contesto delle cellule CD4+CD25<sup>high</sup> mostra di fatto proprietà regolatorie. Ciò che resta dunque da comprendere è la natura di quei linfociti che, pur esprimendo il recettore dell'IL2 ad alti livelli, non sviluppano una capacità soppressoria. L'osservazione di alti livelli di espressione dei marcatori CD127 e CD49d suggerisce la possibilità che la frazione CD4+CD25<sup>high</sup>CD39<sup>-</sup> comprenda linfociti T effettori recentemente attivati. Al fine di testare questa ipotesi è stata messa a punto una marcatura intracellulare che permettesse di monitorare il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte delle popolazioni cellulari testate. PBMC ottenute da donatori sani sono dunque state stimolate per 4 ore con PMA e ionomicina e marcate con anticorpi diretti contro le proteine CD4, CD25, CD39, IFN $\gamma$  e IL17. La presenza di linfociti pro-infiammatori di natura Th1 e Th17 è stata valutata attraverso analisi citofluorimetrica. L'analisi effettuata ha permesso di riscontrare la presenza di una percentuale variabile di linfociti T CD4 IFN $\gamma$  positivi e linfociti T CD4 IL17 positivi –nonché una frequenza trascurabile di linfociti doppio-positivi- nell'ambito del compartimento CD25<sup>high</sup> (8.30 $\approx$ 7.30 and



0.90≈0.63 respectively) (Figura 8A e 8B). La totalità dei linfociti pro-infiammatori risulta confinata nella frazione CD39-CD49d+ (Figura 9A).

La stessa analisi fenotipica è stata poi estesa al sangue periferico di pazienti affetti da sclerosi multipla; anche in questo caso è stato possibile riscontrare una contaminazione della frazione CD4+CD25high da parte di linfociti Th1 e Th17, anche essi confinati nella frazione CD39-CD49d+ (Figura 9B).

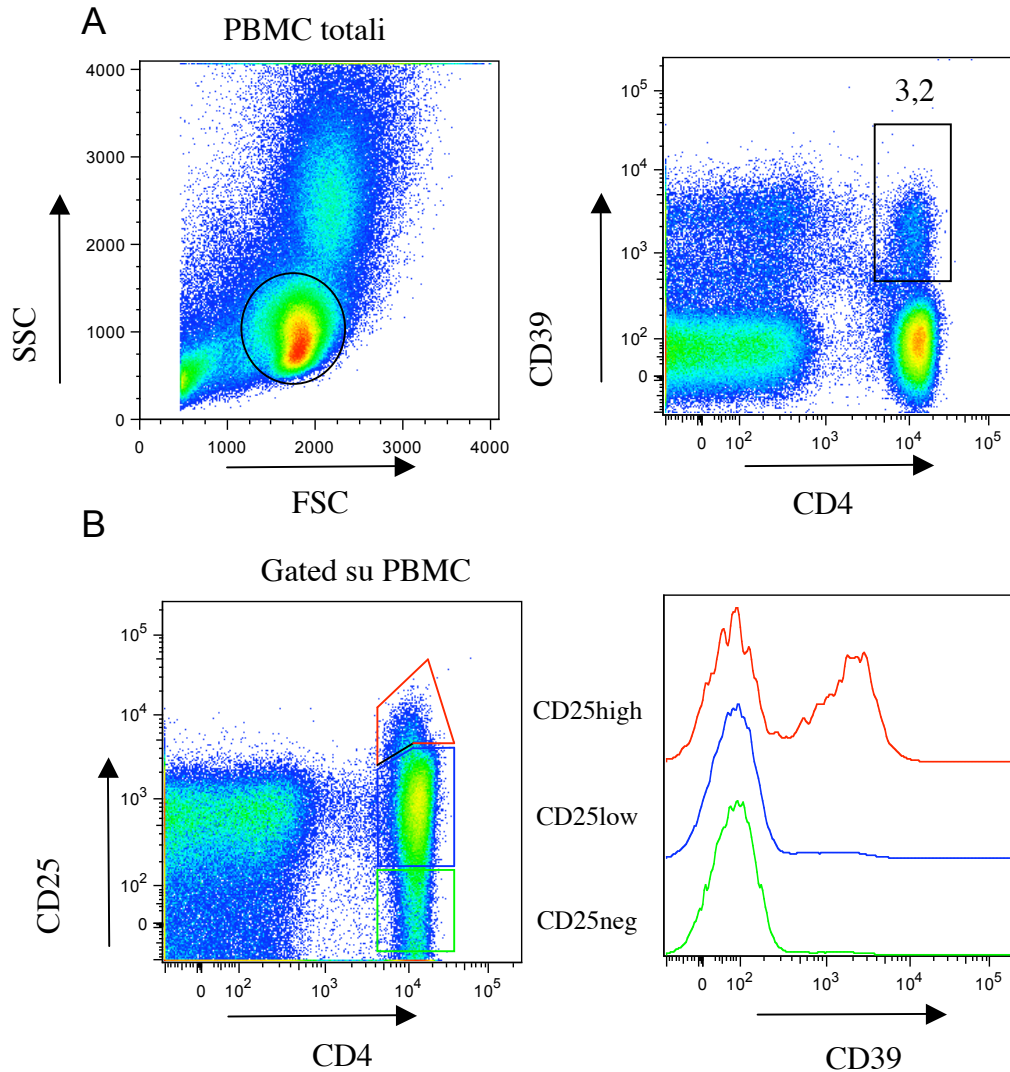
#### **7.1.19. La frequenza dei linfociti Th1 e Th17 confinati nella frazione CD4+CD25high risulta aumentata in pazienti MS in fase acuta di malattia**

La sclerosi multipla è una malattia autoimmune prevalentemente mediata da linfociti CD4+. Entrambe le popolazioni Th1 e Th17 alimentano il processo infiammatorio che contribuisce allo sviluppo ed alla progressione della malattia. Alla luce di ciò è stata messa a punto un'analisi citofluorimetrica che permettesse di valutare la frequenza delle popolazioni CD4+IFN $\gamma$ + e CD4+IL17+ in PBMC ottenute da 12 pazienti nella fase stabile e da 10 pazienti in fase acuta di malattia. I dati ottenuti sono stati poi messi a confronto con quelli derivanti dall'analisi effettuata su 12 donatori sani. L'analisi è stata estesa tanto alla frazione di cellule T effettrici CD4+CD25low, quanto a quella CD4+CD25high, comprendente linfociti recentemente attivati. La frequenza dei linfociti Th1 e Th17 confinati nella popolazione effettrice CD25low non risulta alterata nei pazienti affetti da sclerosi multipla (Figura 10A). Spostando però l'attenzione sulla frazione CD25high, la situazione appare diversa. La frequenza di entrambe le popolazioni IFN $\gamma$  e IL17 positive, infatti, risulta aumentata nel sangue periferico dei pazienti in fase acuta di malattia, e appare invece mantenuta nei soggetti in fase stabile (Figura 10B). Ciò suggerisce che la popolazione effettrice che esprime il

recettore per l'IL2 ad alti livelli possa essere quella attivamente coinvolta nel processo infiammatorio in atto nei pazienti in fase attiva; i dati ottenuti confermano in ogni caso lo stato di attivazione linfocitaria che ci si aspetterebbe effettivamente di riscontrare nel sangue periferico del malato durante il corso delle riacutizzazioni.

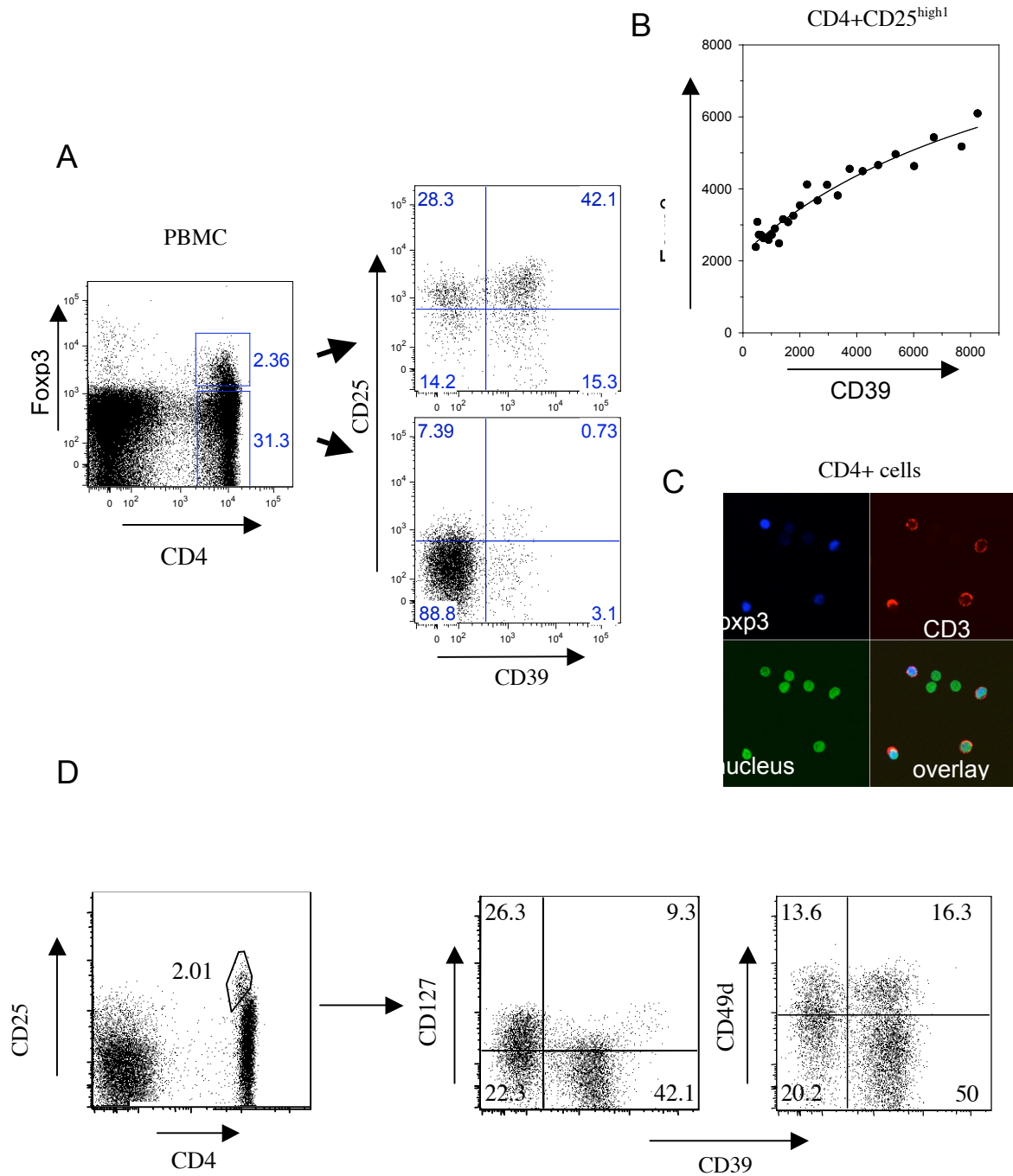
# Capitolo VIII

## 8.1. Figure



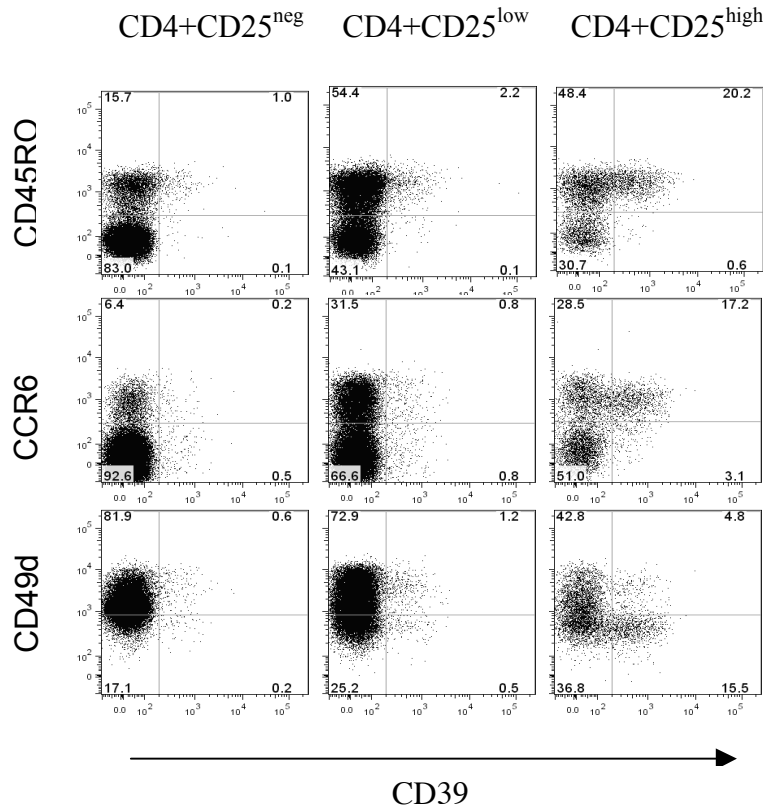
**Figura 1. Espressione del CD39 su linfociti CD4+CD25high.** (A): PBMC ottenute da donatore sano sono state marcate con anticorpi anti CD4, CD25 e CD39 ed analizzate al citofluorimetro. L'espressione del CD39 è mostrata in

correlazione con quella del CD4: nel donatore sano la percentuale dei linfociti CD4+CD39+ si aggira intorno al 3-4% delle PBMC totali. (B): l'analisi citofluorimetrica è stata poi applicata alle 3 popolazioni linfocitarie che si caratterizzano, all'interno del subset CD4+, per la diversa espressione del CD25. In particolare è stata monitorata l'espressione del CD39 sulla superficie dei tre subsets linfocitari.

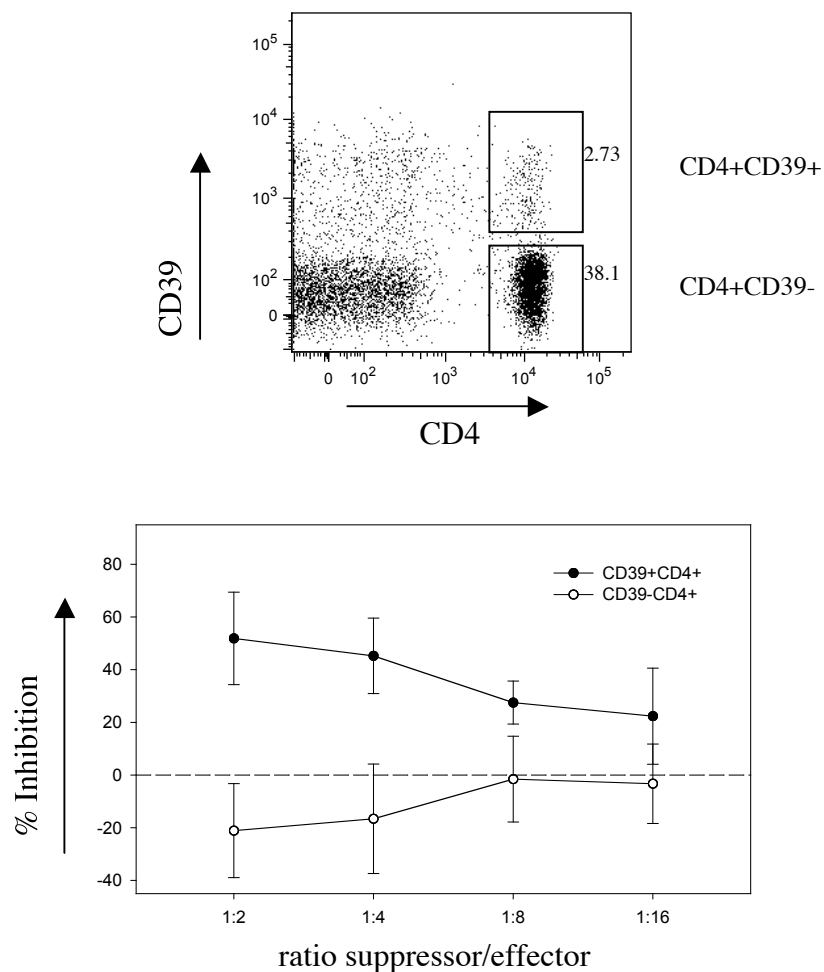


**Figura 2. Espressione del CD39 in correlazione con marcatori che contraddistinguono la popolazione CD4 regolatoria.** (A): è stata applicata un'analisi citofluorimetrica alle popolazioni CD4+Foxp3+ e CD4+Foxp3-, osservate nell'ambito di PBMC umane. L'espressione del CD39 da parte delle due

frazioni cellulari è mostrata in correlazione con quella del CD25 (B): la figura mostra l'intensità media di fluorescenza del CD39 e del Foxp3 espressi dalla popolazione CD4+CD25high di un donatore. I punti che compongono l'iperbola di regressione sono stati ottenuti calcolando, tramite FACS, la MIF del CD39 in relazione a *gate* sempre più stringenti effettuati sulle cellule Foxp3 positive. (C) Linfociti CD4 isolati da PBMC sono stati marcati per il CD39 e il Foxp3 e dunque osservati attraverso microscopia confocale laser. La marcatura del nucleo cellulare è stata effettuata utilizzando il colorante DAPI. (D): la popolazione CD4+CD25high di un donatore è stata monitorata per l'espressione del CD127 e del CD49d, in correlazione con il CD39.

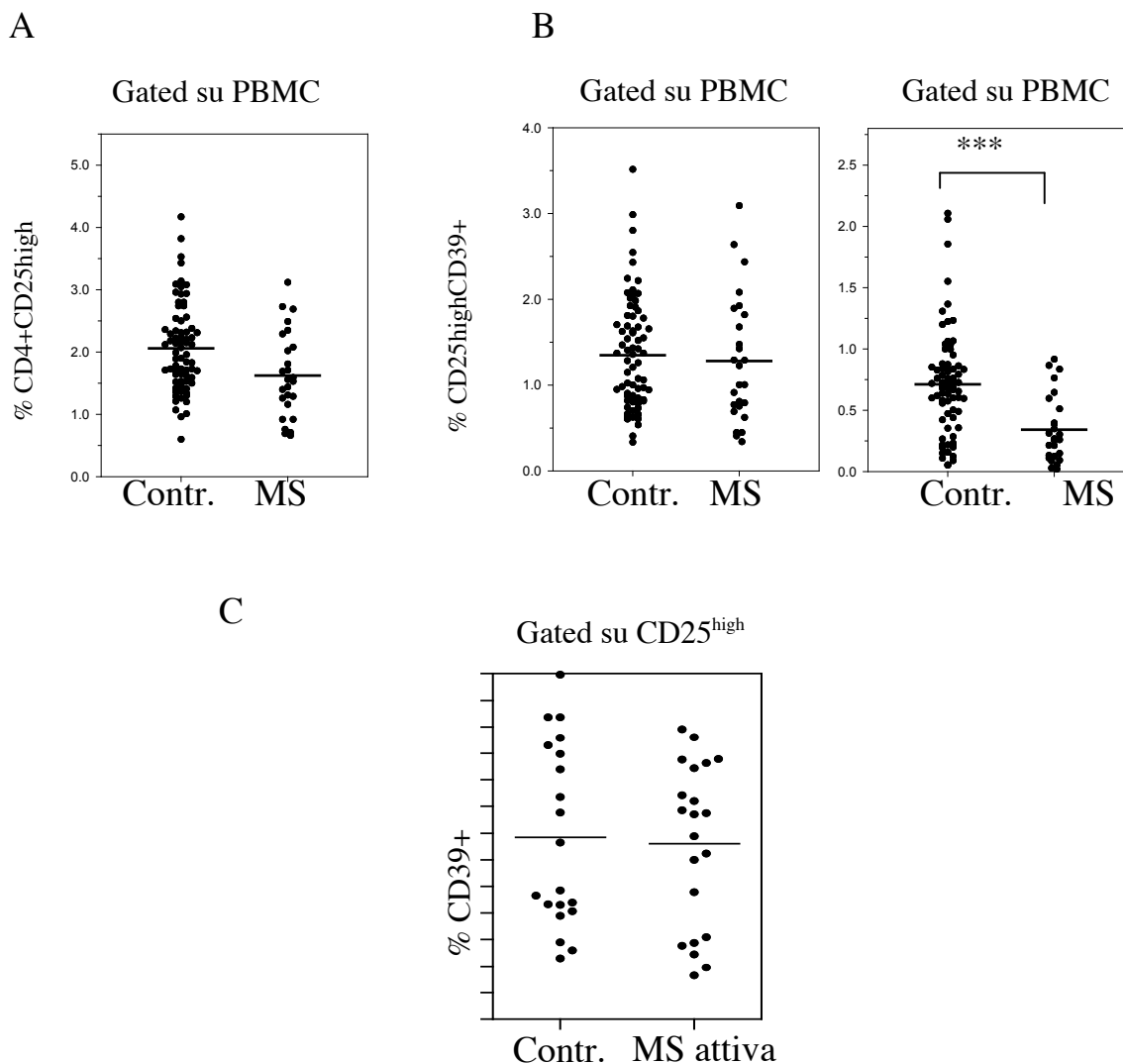


**Figura 3. IL CD39 definisce un subset di cellule regolatorie memory ( $T_{REM}$ ).** Le popolazioni linfocitarie CD4+CD25<sup>high</sup>, CD4+CD25<sup>low</sup> e CD4+CD25<sup>neg</sup> sono state analizzate per l'espressione dei marcatori CD45RO, CCR6 e CD49d, osservata in correlazione con quella del CD39. I plot mostrati derivano da un *gate* effettuato sulle PBMC di un donatore sano



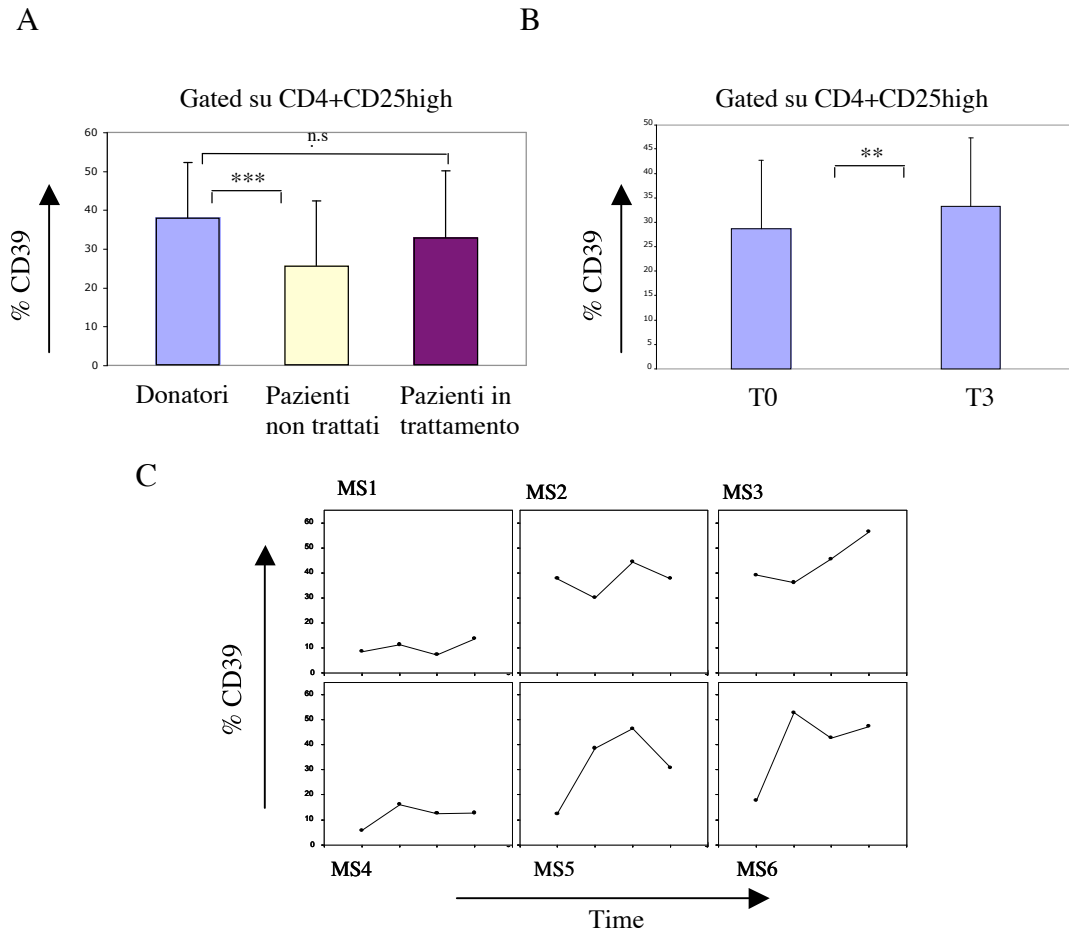
**Figura 4. La capacità regolatoria della popolazione linfocitaria CD4+ è confinata nella frazione CD39+.** Linfociti CD4+CD39+ e CD4+CD39- sono stati sortati e testati funzionalmente in un assay di soppressione in vitro. L'attività inibitoria delle due popolazioni è stata determinata utilizzando linfociti CD4+CD25- responder, la cui proliferazione è stata valutata attraverso incorporazione di timidina  $^3\text{H}$ . L'inibizione della proliferazione è espressa come percentuale. Le barre di errore indicano la deviazione standard relativa ad ogni punto considerato.



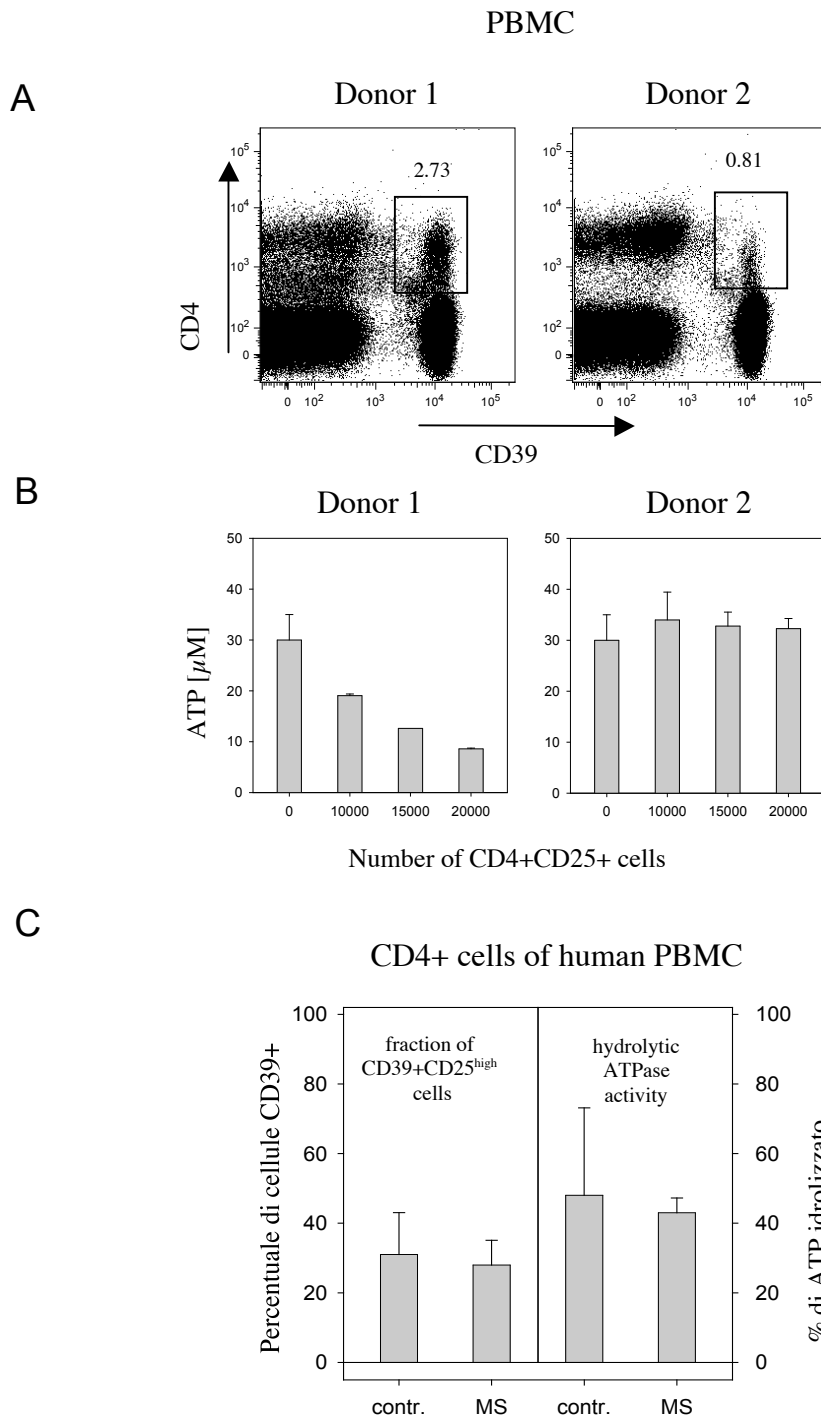


**Figura 5. La frequenza delle Treg CD39+ risulta diminuita nei pazienti affetti da sclerosi multipla.** PBMC ottenute da 74 donatori e 26 pazienti MS sono state analizzate per l'espressione dei marcatori CD4 e CD25. (A): la frequenza della popolazione linfocitaria CD4+CD25<sup>high</sup> è confrontabile con quella della stessa popolazione nei pazienti MS. Nel plot viene indicata la percentuale di ciascuna popolazione considerata nel contesto delle PBMC totali. (B): le PBMC prese in considerazione nella figura (A) sono state marcate per l'espressione del CD39 e la frequenza delle popolazioni CD4+CD25<sup>high</sup>CD39+ e CD4+CD25<sup>high</sup>CD39- nei

sani è stata messa a confronto con quella delle stesse popolazioni nei pazienti MS. (C): il plot mostra la percentuale dei linfociti CD39+ nell'ambito della frazione CD4+CD25high; il confronto viene effettuato questa volta tra i donatori sani e pazienti MS in fase attiva.



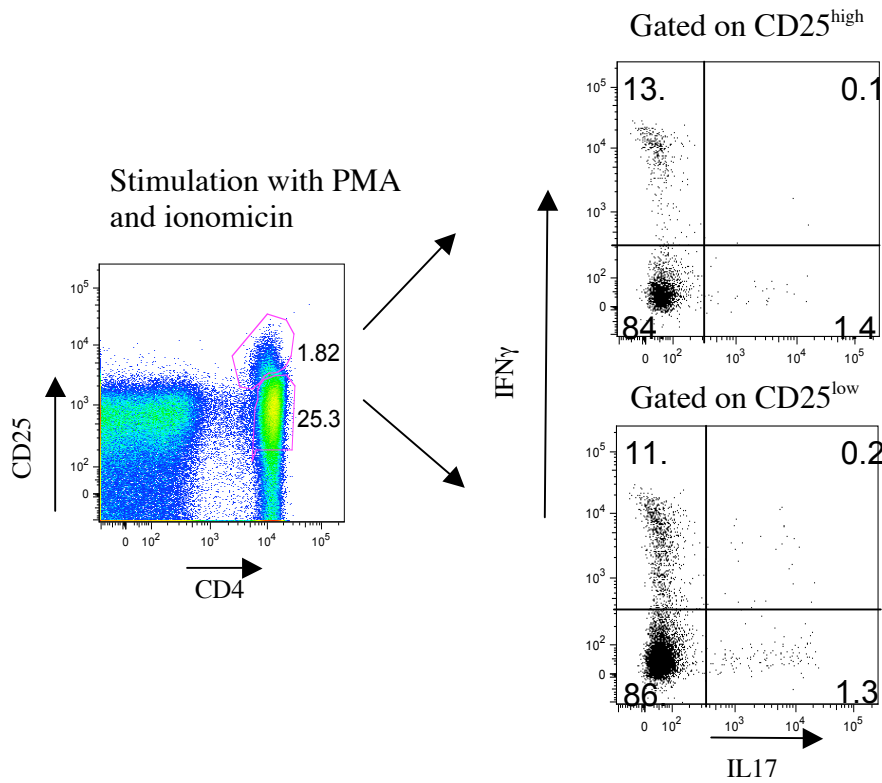
**Figura 6. La frequenza dei linfociti regolatori CD4+CD25highCD39+ aumenta in seguito a trattamento con Interferon  $\beta$  in pazienti MS.** (A): PBMC ottenute dal sangue periferico sono state analizzate al fine di valutare al citofluorimetro la frequenza di linfociti CD39+ *gated* su cellule CD4+CD25high. Le barre rappresentano rispettivamente la media di 74 donatori sani, 26 pazienti non sottoposti a trattamento e 12 pazienti in corso di terapia con interferone. (B): il plot mostra la frequenza di linfociti CD39+ nel contesto della frazione CD4+CD25high. Le barre rappresentano la media della frequenza misurata prima del trattamento e a 3 mesi dall'inizio dello stesso. (C): la tabella mostra l'andamento della frequenza della popolazione CD39+ in 6 pazienti MS, nel corso del trattamento con interferone.



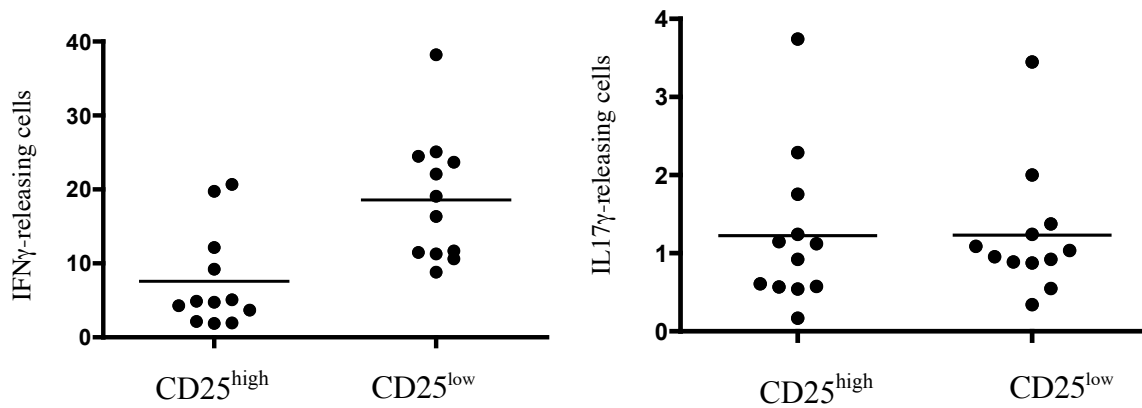
**Figura 7. (A):** La capacità di idrolizzare ATP, espressa dai linfociti CD4+CD25<sup>high</sup>, dipende dall'espressione del CD39 ed è mantenuta nei pazienti MS. PBMC da due differenti donatori sono state marcate con anticorpi contro il CD4, CD25 e CD39 al fine di valutare la frequenza della popolazione

CD4+CD39+. La figura mostra la variabilità che è possibile riscontrare tra un donatore e l'altro. (B): Linfociti CD4+CD25<sup>high</sup> sono stati sortati dai due differenti donatori analizzati in figura (A) e le popolazioni ottenute, che esprimono livelli di CD39 pari al 46% ed al 20% rispettivamente, sono state testate per la capacità di idrolizzare l'ATP. (C) Linfociti CD4+ sono stati sortati da 5 donatori sani e 3 pazienti MS; i campioni presi in esame sono stati selezionati poiché presentavano livelli di espressione confrontabili del CD39. Nel pannello di destra è mostrata l'attività ATPasica dei linfociti sortati. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard.

A



B

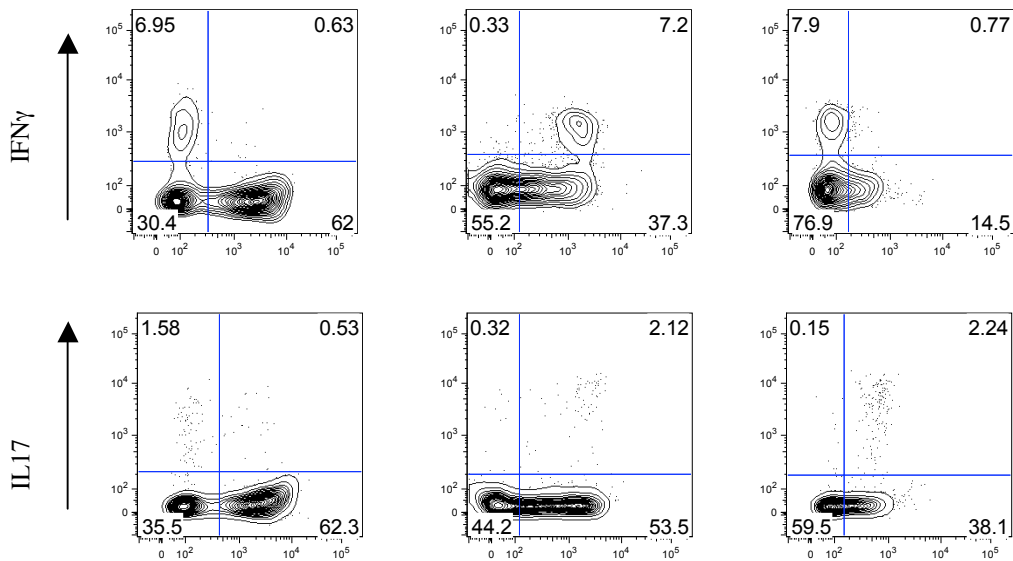


**Figura 8. La popolazione linfocitaria CD4+CD25<sup>high</sup> comprende linfociti T effettori Th1 e Th17.** PBMC da donatori sani sono state stimulate con PMA e ionomicina e analizzate per via citofluorimetrica. (A): è stata messa a punto una marcatura intracellulare al fine di monitorare il rilascio di IFN $\gamma$  e IL17 da parte dei linfociti CD4+CD25<sup>high</sup> e CD4+CD25<sup>low</sup>. (B): i plots mostrano la

frequenza di linfociti IFN $\gamma$ + e IL17+ calcolata nel contesto delle popolazioni CD4+CD25<sup>high</sup> e CD4+CD25<sup>low</sup>. I dati riportati sono relativi a 12 donatori.

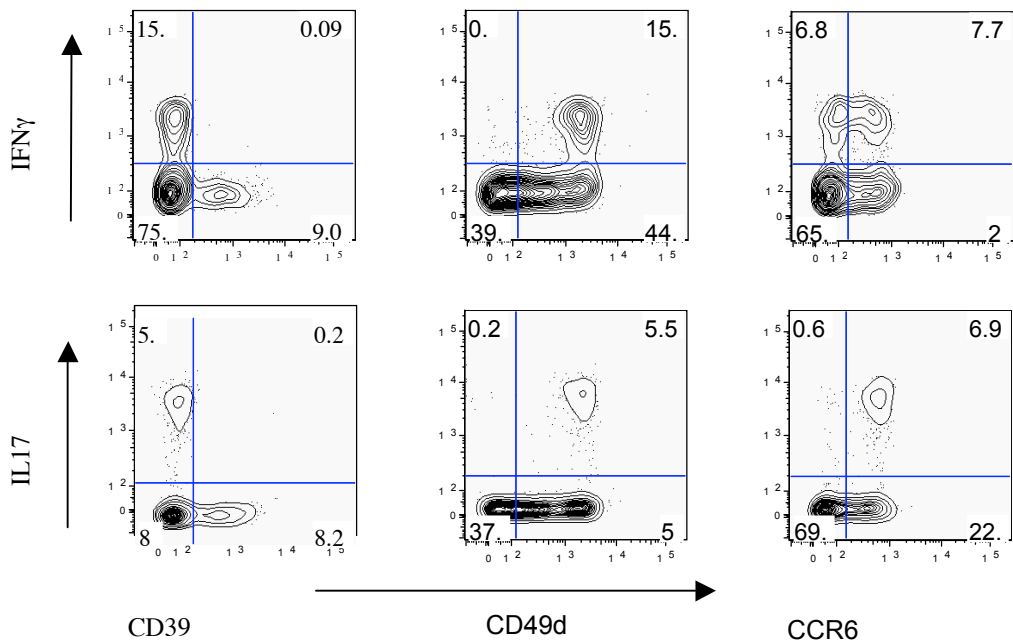
A

Gated su CD4+CD25high  
ottenute da donatore sano



B

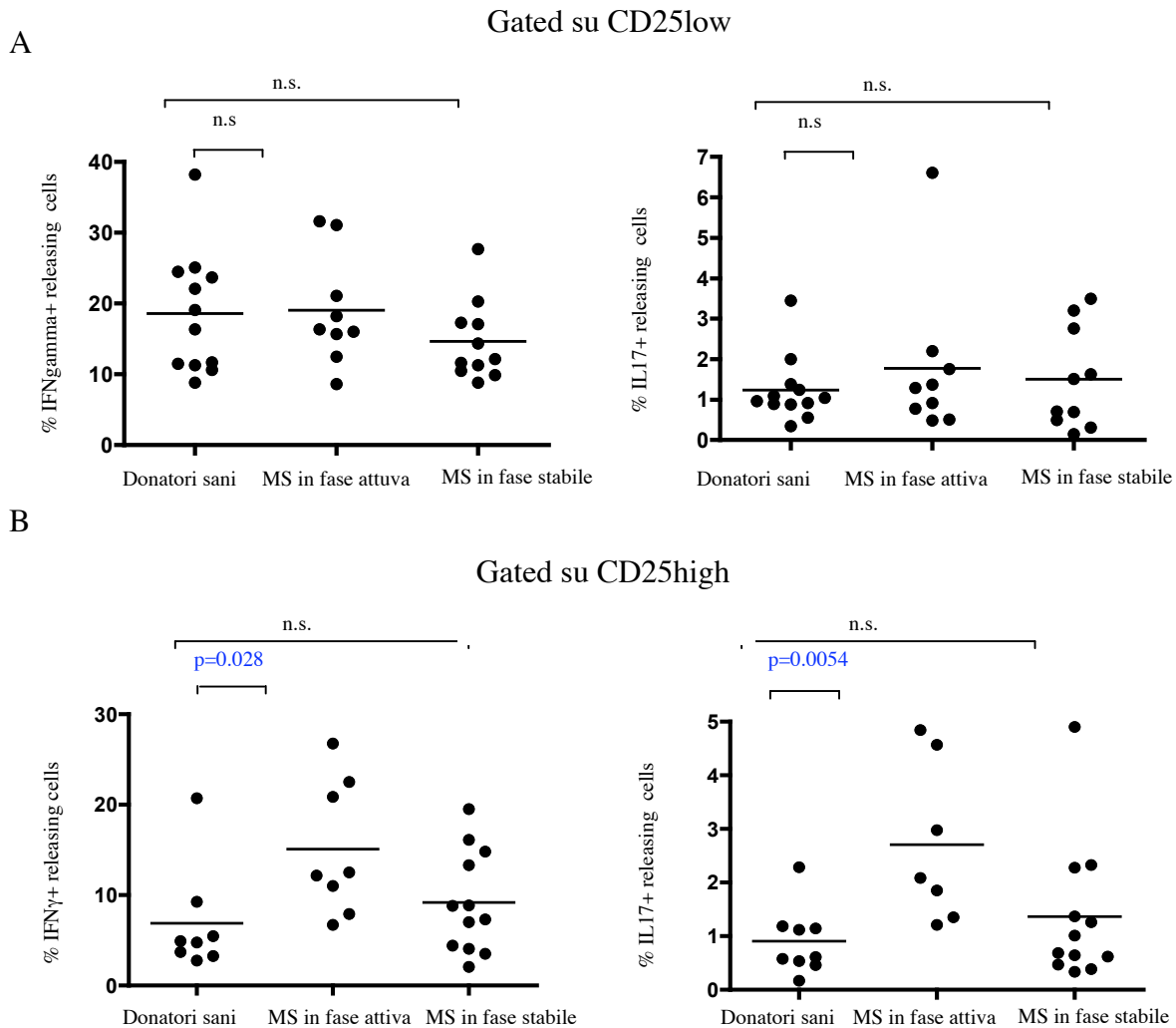
Gated su CD4+CD25high  
ottenute da paziente MS



**Figura 9. I linfociti Th1 e Th17 che contaminano il subset CD4+CD25high sono contenuti nella frazione CD39-, tanto nel sano quanto nel paziente. Linfociti CD4+CD25high ottenuti da PBMC di donatori sani e pazienti MS, sono**



stati marcati al fine di monitorare il rilascio di citochine pro-infiammatorie. Più nel dettaglio, l'espressione dell'IFN $\gamma$  e dell'IL17 è stata osservata in correlazione con marcatori quali il CD39, il CD49d ed il CCR6. I plot rappresentano l'analisi relativa ad un soggetto sano ed uno malato.



**Figura 10.** La frequenza dei linfociti Th1 e Th17 CD25<sup>high</sup> è aumentata nei pazienti MS in fase acuta di malattia. PBMC ottenute da 12 donatori sani, 10 pazienti MS in fase acuta di malattia e 12 pazienti MS in fase stabile di malattia sono state analizzate per il rilascio di citochine pro-infiammatorie. (A): i plots mostrano la frequenza delle popolazioni IFN $\gamma$ + e IL17+ nell'ambito dei linfociti CD4+CD25<sup>low</sup>. Le barre rappresentano i tre gruppi di soggetti presi in esame. (B): la frequenza dei linfociti che rilasciano citochine pro-infiammatorie è stata poi monitorata nell'ambito della popolazione CD4+CD25<sup>high</sup>.

# Capitolo IX

## 9.1. Discussione

Molteplici studi condotti nell'ambito delle patologie autoimmuni suggeriscono che alterazioni a carico dei sistemi di regolazione della risposta immunitaria siano coinvolti nella patogenesi di queste malattie. L'attenzione del mondo scientifico si è in particolare concentrata, negli ultimi anni, sulla popolazione di linfociti T CD4 con funzione immunoregolatoria. Diverse sono le evidenze che attestano sia una diminuzione della frequenza, che alterazioni a livello funzionale di questa frazione linfocitaria, nei pazienti affetti da sclerosi multipla. I risultati ottenuti in questo ambito sono però ancora poco esaustivi, ed in alcuni casi contraddittori. Ciò è dovuto alla difficoltà di caratterizzare in modo altamente specifico la popolazione di linfociti T regolatori nell'uomo. L'individuazione del Foxp3 come fattore di trascrizione espresso costitutivamente dai linfociti dotati di attività soppressoria, ha di certo rappresentato un punto di svolta nella caratterizzazione di questa frazione cellulare. Purtroppo però la localizzazione intracellulare del Foxp3 ne limita totalmente l'applicazione clinica, poiché ne impedisce l'utilizzo per l'isolamento ex vivo della popolazione soppressoria.

Il presente studio si inserisce in questo ambito e si propone di contribuire alla caratterizzazione fenotipica e funzionale dei linfociti CD4 regolatori nell'uomo. L'analisi fenotipica di PBMC ottenute da donatori sani ha rivelato che l'espressione dell'ectonucleotidasi CD39 caratterizza in maniera specifica una sottopopolazione del subset linfocitario CD4+CD25high, e permette di distinguerla dai linfociti CD4+ attivati e naive. Circa il 35% della popolazione CD4+CD25high presenta il CD39 sulla propria superficie, mentre l'ectonucleotidasi è espressa

solamente da una porzione trascurabile di cellule CD4+CD25<sup>low</sup> ed è totalmente assente nei linfociti CD4+CD25<sup>neg</sup>. Dati ottenuti in citofluorimetria e confermati al microscopio confocale hanno inoltre rivelato l'esistenza di una correlazione lineare tra l'espressione del CD39 e quella del fattore di trascrizione Foxp3 sulle cellule CD4 positive, suggerendo che il CD39 possa di fatto assumere il ruolo di biomarker di superficie della popolazione CD4 soppressoria.

Laplaud e colleghi hanno recentemente individuato un marcatore di attivazione, il CD127, che risulta down-regolato dalle cellule CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> dotate di capacità soppressoria (60). Di fatto l'espressione del CD39 correla inversamente con quella del CD127, e ciò avvalorava la sua importanza come marcatore specifico del subset regolatorio.

Il dato fenotipico è stato poi confermato da un'analisi di tipo funzionale; saggi di proliferazione in vitro hanno infatti rivelato che la capacità soppressoria delle popolazioni T CD4 testate è confinata esclusivamente nella frazione CD39 positiva. Ciò implica come prima cosa la possibilità di utilizzare l'espressione del CD39 al fine di isolare la popolazione regolatoria effettivamente capace di sopprimere; in secondo luogo i dati ottenuti suggeriscono che l'ectonucleotidasi possa essere in qualche modo coinvolta nel meccanismo vero e proprio di soppressione della proliferazione delle cellule T bersaglio.

Sono stati quindi messi a punto test funzionali che saggiassero l'attività ATPasica del CD39 espresso sulla superficie linfocitaria. Questi saggi hanno rivelato che le popolazioni linfocitarie CD4+CD25<sup>high</sup> sortate sono effettivamente in grado di scindere ATP; tale attività enzimatica è inoltre strettamente dipendente dall'espressione del CD39 stesso. Il fatto che le cellule regolatorie CD4+CD25<sup>high</sup> siano dotate di attività ATPasica apre notevoli risvolti nella comprensione dei loro meccanismi di soppressione. L'ATP è un nucleotide che a livello extracellulare media una molteplicità di azioni pro-infiammatorie, tra le quali l'attivazione

linfocitaria e la maturazione di cellule dendritiche. In particolare, l'ATP è contenuto a concentrazioni molto elevate nel citoplasma cellulare, e durante l'infiammazione, in seguito alla morte cellulare, viene liberato nell'ambiente extracellulare segnalando l'esistenza di una situazione di "pericolo". Le cellule dendritiche possiedono recettori per l'ATP e rispondono con rapidità e vigore alla presenza di ATP extracellulare mediante la secrezione di citochine pro infiammatorie. I linfociti CD39+ agiscono quindi promuovendo lo spegnimento di tali segnali attivatori. L'azione regolatoria mediata dai linfociti che esprimono l'ectonucleotidasi ha poi anche conseguenze indirette, in quanto l'azione del CD39, in collaborazione con altre nucleotidasi, promuove la formazione di adenosina, dalle spiccate proprietà anti-infiammatorie. Bopp e colleghi hanno dimostrato la potenzialità delle cellule regolatorie di inibire la proliferazione di linfociti bersaglio attraverso l'utilizzo dell'AMP ciclico (80); inoltre un lavoro recente di Deaglio e colleghi conferma pienamente le ipotesi qui avanzate circa il ruolo svolto dal CD39 sulla superficie linfocitaria (81). Questi dati nel loro insieme indicano la possibilità che le molecole nucleotidiche e i loro derivati svolgano un ruolo prominente a livello della sinapsi immunologica e dunque nel controllo dell'equilibrio esistente tra regolazione ed attivazione linfocitaria.

Il raggiungimento di conoscenze più approfondite circa le caratteristiche della popolazione regolatoria nell'uomo, ha portato alla consapevolezza che il subset linfocitario CD4+CD25<sup>high</sup> è caratterizzato da una composizione piuttosto eterogenea. Il CD25 è infatti un marcatore di attivazione linfocitaria, e ciò può far supporre che la popolazione CD25<sup>high</sup> sia contaminata da linfociti effettori. È stata dunque messa a punto un'analisi citofluorimetrica che ha rivelato la presenza di linfociti Th1 e Th17 nel contesto dei linfociti CD4+CD25<sup>high</sup>. Queste cellule effettrici esprimono marcatori di attivazione linfocitaria, quali CD127 e CD49d. Tali caratteristiche, accanto all'espressione ad alti livelli del CD25, suggeriscono

che tali popolazioni possano essere costituite da linfociti recentemente attivati, che non hanno ancora down-regolato il recettore per l'interleuchina 2. Si potrebbe speculare che nell'ambito di uno stato infiammatorio, ad esempio quello in atto in corso di sclerosi multipla, i linfociti CD4+CD25high Th1 e Th17 siano quelli attivamente coinvolti nella risposta immunitaria in atto.

Studi recenti hanno portato a supporre che il fattore di trascrizione Foxp3 possa essere up-regolato durante l'attivazione linfocitaria, tanto che nel modello murino è stata osservata la presenza di cellule CD4+CD25+Foxp3+ on grado di rilasciare citochine pro-infiammatorie. Akbar e colleghi hanno inoltre elegantemente dimostrato come popolazioni CD4 regolatorie possano essere indotte da cellule CD4 naive direttamente nel sito dell'infezione (82). Questi dati conducono alla affascinante ipotesi secondo cui cellule T regolatorie e cellule T effettrici rappresentano gli estremi di un *pathway* di differenziazione a doppio senso, che può essere percorso da una cellula CD4+ in una direzione o nell'altra a seconda dell'ambiente citochinico circostante. Interpretati alla luce di questa ipotesi, i linfociti CD4+CD25high che rilasciano citochine pro-infiammatorie potrebbero rappresentare una fase di transizione tra lo stato di linfocita regolatorio e quello di cellula attivata effettrice, e quindi cellule linfocitarie colte nel mezzo del proprio percorso differenziativo.

Molteplici evidenze suggeriscono che un'alterazione dei meccanismi di regolazione immunitaria possa svolgere un ruolo prominente nella patogenesi delle malattie autoimmuni. Alla luce di ciò la frequenza della popolazione linfocitaria regolatoria CD4+CD25highCD39+ è stata monitorata in pazienti affetti da sclerosi multipla. L'analisi effettuata ha evidenziato una diminuzione significativa di questi linfociti regolatori nel sangue periferico dei pazienti rispetto ai donatori sani. La frequenza delle cellule CD39+ appare invece ripristinata in fase acuta di malattia. L'alterazione osservata a carico dei linfociti regolatori potrebbe ripercuotersi sul

controllo della reazione infiammatoria e condurre alla iperproliferazione di quelle cellule autoreattive da cui si sviluppa la reazione autoimmune. Si può infatti supporre che la diminuzione della frequenza dei linfociti soppressori CD4+CD25highCD39+ risulti nello sbilanciamento dell'equilibrio immunologico a favore della reazione infiammatoria. In soggetti predisposti ciò potrebbe appunto sfociare nell'instaurarsi di una risposta contro *il self*.

Nei pazienti affetti da sclerosi multipla in fase attiva di malattia, si assiste ad una espansione della frazione regolatoria, che raggiunge i livelli del sano. Questa espansione potrebbe essere dovuta allo stato di attivazione che coinvolge il sistema immunitario nel suo complesso, durante le fasi di relapse. Il verificarsi della ricaduta stessa e la presenza di placche attive osservate attraverso risonanza nei pazienti considerati, chiaramente suggerisce che la proliferazione delle cellule regolatorie circolanti, o l'induzione di popolazioni regolatorie de novo, non riesce tuttavia a ripristinare l'equilibrio immunologico né quindi a spegnere l'infiammazione in atto.

Una molteplicità di farmaci immunomodulatori sono oggi disponibili per il trattamento della sclerosi multipla. L'interferon beta rappresenta una delle molecole farmaceutiche per prime messe in commercio, e nonostante la messa a punto di nuove prospettive terapeutiche, resta un farmaco di elezione per la cura di pazienti affetti dalla forma recidivante - remittente della malattia, nei quali riduce significativamente la frequenza delle *relapses*. È stata dunque monitorata la frequenza della popolazione di linfociti T regolatori CD4+CD25highCD39+ nel sangue di pazienti prima e dopo trattamento con interferon beta, al fine di valutare se i benefici apportati dal farmaco fossero in qualche modo legati ad effetti sul subset regolatorio linfocitario.

L'analisi della frequenza dei linfociti soppressori nei campioni osservati prima del trattamento ne ha confermato una diminuzione significativa. Dopo 3 mesi di

trattamento la popolazione CD4+CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> va invece incontro ad un'espansione che tende a ripristinarne i livelli presenti nel sano. Dati preliminari mostrano inoltre che tale espansione tende a confermarsi e ad aumentare nel tempo, così che ad un anno dal trattamento la frequenza della popolazione regolatoria tende a ristabilirsi nei pazienti osservati.

Resta da comprendere la natura degli effetti esercitati dall'interferone beta a carico del subset CD4 soppressorio. Si potrebbe speculare che l'azione immunomodulatoria esercitata dal farmaco a carico delle cellule presentanti l'antigene, possa in qualche modo modificarne l'interazione con la popolazione di linfociti T regolatori, conducendo all'attivazione di quest'ultima. La capacità del farmaco di modificare l'ambiente citochinico in senso anti-infiammatorio, agendo proprio sulle cellule APC, potrebbe inoltre favorire la differenziazione di cellule CD4 naive in linfociti regolatori, e dunque portare ad un aumento della loro frequenza. L'espansione della popolazione CD4+CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> osservata nei pazienti considerati, potrebbe dunque essere dovuta tanto alla proliferazione di un subset regolatorio già esistente, quanto al differenziamento *de novo* di linfociti naive.

I dati fin qui discussi sembrano confermare che lo sbilanciamento dell'equilibrio immunologico, che si crea nel sano tra popolazioni regolatorie ed effettrici, svolga un ruolo di primo piano nella patogenesi della sclerosi multipla. Al fine dunque di osservare più da vicino il coinvolgimento delle popolazioni effettrici nella risposta immunitaria in atto nei pazienti affetti dalla patologia autoimmune, è stata monitorata la frequenza delle popolazioni effettrici CD4+Th1 e CD4+Th17, cui si attribuisce un ruolo di primo piano nello stato infiammatorio in atto in corso di malattia. L'analisi effettuata ha rivelato che la frequenza dei linfociti CD4+CD25<sup>low</sup> in grado potenzialmente di rilasciare IFN $\gamma$  e IL17 rimane invariata nei pazienti, in ogni fase di malattia. L'osservazione dei linfociti Th1 e



Th17 recentemente attivati (CD25high) ha invece messo in luce un aumento significativo del numero di linfociti effettori nei pazienti affetti da sclerosi multipla, nel corso delle fasi attive della patologia. Si può supporre che l'espansione di queste popolazioni effettrici sia il risultato di quella stessa attivazione immunitaria che, durante le ricadute, è potenzialmente responsabile dell'induzione del subset regolatorio.

Laplaud e colleghi hanno recentemente mostrato che la popolazione linfocitaria regolatoria CD4+CD25highCD127- è perfettamente in grado, nei pazienti affetti da sclerosi multipla, di esprimere la propria attività soppressoria (60). Alla luce della correlazione esistente tra CD39 e CD127 nell'ambito della frazione CD4+CD25high, possiamo speculare che la funzionalità dei linfociti regolatori CD39+ sia mantenuta nel malato. I dati ottenuti suggeriscono dunque che nei pazienti affetti da sclerosi multipla la popolazione CD4 soppressoria è di fatto funzionale, ma affetta nella frequenza. Sebbene quindi questa popolazione vada incontro ad espansione nel corso delle ricadute, si può supporre che tale espansione non compensi la contemporanea proliferazione dei linfociti T autoreattivi. Lo spostamento dell'equilibrio tra regolazione ed infiammazione sfocia dunque in tal modo, nei soggetti predisposti, nella risposta autoimmune.

# Capitolo X

## 10.1. Bibliografia

1. McFarlin DE, Mc Farland HF, 1982. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.*
2. Mireia Sospedra and Roland Martin, 2005. Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol.*
3. David A. Hafler, 2004. *J Clin Invest.*
4. Hohol MJ, et al, 1999. Treatment of progressive multiple sclerosis with pulse cyclophosphamide/methylprednisolone: response to therapy is linked to the duration of progressive disease. *Mult Scler.*
5. Dyment DA et al, 2004. Genetic of multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.*
6. Hillert J et al, 1993. HLA and *MS Neurology.*
7. Ben Nun A. et al, 1981. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunology.*
8. Goverman j et al, 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell.*
9. Moore FG and Wolfson C, 2002. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.*
10. Wandinger KP et al, 2000. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in multiple sclerosis. *Neurology.*
11. Serafini B et al, 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.*
12. Junker A et al, 2007. Multiple Sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain.*

13. Babbe H, 2000. Clonal expansion of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single polymerase chain reaction. *J Exp Med*.
14. Zhang YC et al, 2004. Increased CD8+ cytotoxic T cells responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol*.
15. Jacobsen M et al, 2001. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients.
16. Neumann H et al, 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS disease. *Trends Neurosci*.
17. Stinissen P et al, 1995. Increased frequency of  $\gamma\delta$  T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis: reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J of Immunology*.
18. Battistini L et al, 1997. Phenotypic and Cytokine Analysis of Human Peripheral Blood  $\gamma\delta$  T Cells Expressing NK Cell Receptors. *J of Immunology*.
19. Hvas J et al, 1993.  $\gamma\delta$  T cell receptor in brain lesions of patients with multiple sclerosis. *J of Neuroimmunology*.
20. Chen Z et al, 2008. Correlation of specialized CD16+  $\gamma\delta$  T cells with disease course and severity in multiple sclerosis. *J of Neuroimmunology*.
21. Freedman M. S et al, 1991. M.S. Peripheral blood gamma–delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes, *Ann Neurol*.
22. Franciotta D et al, 2008. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*.
23. Primeas JW et al, 1979. Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science*.

24. Serafini B et al, 2004. Detection of ectopic B-cells follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Path.*
25. Serafini B et al, 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Ex Med.*
26. Hauser SL et al, 2008. B-cell depletion with Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.*
27. Ousman SS et al, 2007. Protective and therapeutic role for  $\alpha\beta$ -crystallin in autoimmune demyelination. *Nature.*
28. Mathey EK et al, 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Ex Med.*
29. Lunemann JD et al, 2007. Epstein-Barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J Virol.*
30. Panitch HS et al, 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet.*
31. Moldovan IR et al, 2003. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol.*
32. Langrish CL et al, 2005. IL23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Ex Med.*
33. Lock C et al, 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.*
34. Hedegaard CJ et al, 2008. T helper cell type 1 (Th1), Th2a nd Th17 rponses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology.*

35. Vaknin-Dembinsky A et al, 2006. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol*
36. Adorini L et al, . Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology today*.
37. Battistini L et al, 1996. CD1b is expressed in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*.
38. Meinl E et al, 1994. Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain*.
39. Aloisi F et al, 1999. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol*.
40. Baecher-Allan C et al, 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev*.
41. Torgerson T.R, 2006. Regulatory T cells in human autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol*.
42. Valencia X et al, 2007. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*.
43. Putheti P et al, 2004. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol*.
44. Viglietta V et al, 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Ex Med*.
45. Feger U et al, 2007. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*.
46. Huan J et al, 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res*

47. Venken K et al, 2008. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*.
48. Borsellino G. et al, 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*.
49. Durelli L, 2001. La terapia della sclerosi multipla.
50. Hong J et al. 2005. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of f transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
51. Weber MS et al, 2007. Mechanism of action of Glatiramer Acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutic*.
52. Hughes R, 1997. Interferon beta-1 in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: the clinical result of a large multicentre study. *Mult Scler*.
53. Bornstein MB et al, 1987. A pilot trial of Cop-1 in exacerbating-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*.
54. Comi G et al, 2001. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effect of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging – measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. *European./Canadian Glatiramer Acetate Study Group*.
55. Kleinschitz C et al, 2007. The trials and errors in MS therapy.
56. Linker RA et al, 2008. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. *Cell*.
57. Langer-Gould A et al, 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*.

58. Yousry TA et al, 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*.
59. Huan J et al, 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J of Neuroscience research*.
60. Michel L et al, Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest*.
61. Venken K et al, 2008. Natural naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*.
62. Burnstock G et al, 1977. The purinergic nerve hypothesis. *Ciba Found Symp*.
63. Abbracchio MP et al, 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y receptors? *Pharmacol Ther*.
64. Abbracchio MP et al, 1998. Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*.
65. Communi D et al, 2000. Advances in signaling by extracellular nucleotides : the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cellular Signaling*.
66. Atarashi K et al, 2008. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*.
67. Piccini A et al, 2008. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *PNAS*.
68. Idzko M et al, 2002. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood*.

69. Sullivan GW et al, 1998. Role of A2a adenosine receptor in inflammation. *Drud Dev Res.*
70. Csoka B et al, 2008. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *Faseb J.*
71. Sakaguchi S et al, 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.*
72. Rudensky AY et al, 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.*
73. Bennet CL et al, 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.*
74. Brunkow ME et al, 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.*
75. Kleinewietfeld M et al, 2008. CD49d provides access to 'untouched' human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood.*
76. Pandiyan P et al, 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.*
77. Liu W et al, 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Ex Med.*
78. Kleinewietfeld M et al, 2005. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood.*
79. Valmori D et al, 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Investig.*
80. Bopp T et al, 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Ex Med.*



81. Deaglio S et al, 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Ex Med*.
82. Vukmanovic-Stejić M et al, 2008. The kinetics of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest*.