



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica
Sezione di Medicina Interna**

CENTRO DI RICERCA, TRASFERIMENTO ED ALTA FORMAZIONE DENOMINATO

Settore Scientifico-Disciplinare MED 04

*Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche
Scuola di dottorato in Medicina Clinica e Sperimentale
XXVIII Ciclo*

Tesi sperimentale

***“Linfociti Th17: ruolo nella fisiologia e nella
fisiopatologia delle risposte immuni”***

Coordinatore
Prof. Francesco Annunziato

Tutor
Prof. Francesco Annunziato

Dottoranda
Dott.ssa Maria Caterina Rossi

Anni 2012/2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO.....	4
1.2 IMMUNITA' INNATA	4
1.3 IMMUNITA' ADATTATIVA.....	7
1.4 I LINFOCITI T E I MECCANISMI EFFETTORI	10
1.5 I LINFOCITI T CD4+	12
1.5.1 I linfociti Th1	16
1.5.2 I linfociti Th2	17
1.5.3 I linfociti Th17	21
1.6 RUOLO DEI LINFOCITI TH1 E TH17 NELLA PATOGENESI DI MALATTIE AUTOIMMUNI	26
1.7 IL CICLO CELLULARE	27
2. MATERIALI E METODI	31
2.1 REAGENTI E ANTICORPI	31
2.2 REPERIMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO	32
2.3 SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI DENSITA' DI CELLULE MNC.....	32
2.4 PURIFICAZIONE ED ESPANSIONE DI CELLULE T.....	33
2.5 SORTING CITOFLUORIMETRICO DI CELLULE PRODUCENTI CITOCHINE	33
2.6 CITOFLUORIMETRIA	34
2.6.1 Analisi citofluorimetrica dei marcatori di superficie.....	34
2.6.2 Analisi citofluorimetrica della produzione intracitoplasmatica di citochine su singola cellula.....	35
2.6.3 Analisi citofluorimetrica dei livelli delle cicline.....	36
2.7 IMMUNOFLUORESCENZA E MICROSCOPIA CONFOCALE.....	36
2.8 TEST DI PROLIFERAZIONE	38
2.9 REAL TIME PCR (RT-PCR)	38
2.10 TRASDUZIONE DEL LENTIVIRUS CONTENENTE RORC2	39
2.11 SILENZIAMENTO GENICO TRANSIENTE MEDIANTE SIRNA.....	39
2.12 IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (CHIP)	40
2.13 MICROARRAY	40
2.14 ANALISI STATISTICA	41
3. RIASSUNTO E SCOPO DELLA TESI	42

4. RISULTATI.....	44
4.1 LE CELLULE TH17 UMANE NON PROLIFERANO E NON PRODUCONO IL-2 IN RISPOSTA ALLO STIMOLO ANTI-CD3/CD28	44
4.2 LE CELLULE TH17 ESPRIMONO ALTI LIVELLI DI IL411	45
4.3 L'INCREMENTO DI IL411 NELLE CELLULE TH17 È STRETTAMENTE DIPENDENTE DAL RORC.....	47
4.4 LE CELLULE TH17 ESPRIMONO ALTI LIVELLI DELLA PROTEINA TOB1	49
4.5 LE CELLULE TH17 MOSTRANO BASSI LIVELLI DEI GENI TARGET E DEI REPRESSORI DELLA PROTEINA TOB1	52
4.6 I LIVELLI ELEVATI DELLA PROTEINA TOB1 DIPENDONO DA IL411.....	55
5. DISCUSSIONE.....	59
6. BIBLIOGRAFIA.....	64

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Sistema Immunitario

Il sistema immunitario è un insieme estremamente specializzato e complesso di molecole, cellule e tessuti che si è sviluppato con l'evoluzione, la cui funzione è quella di proteggere l'individuo da patogeni. La risposta che si realizza nei confronti di sostanze estranee e microrganismi patogeni che abbiano superato le barriere di superficie dell'organismo (difese fisiche e biochimiche di cute e mucose) viene definita come *immunità*. Per definizione la reazione immunitaria non deve arrecare danno all'organismo, quando ciò si verifica si parla di reazioni immunopatogene.

La funzione protettiva si attua mediante dei meccanismi suddivisibili in due grandi categorie:

- *l'immunità innata o naturale*
- *l'immunità acquisita o specifica* [1,2]

La divisione non deve però far pensare ad una netta e marcata separazione funzionale delle due: sono infatti in forte cooperazione, anche se ci sono delle fondamentali differenze, esposte di seguito.

1.2 Immunità innata

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo, è costituita da componenti del sistema immunitario, fattori solubili o recettori di superficie che sono preesistenti all'infezione e pertanto pronti ad agire con rapidità. È il meccanismo filogeneticamente più antico, che si è evoluto per proteggere tutti gli organismi pluricellulari dalle infezioni. Questo tipo di immunità non è dotata di fini sistemi di

riconoscimento clonali, non necessita dell'ingresso di un patogeno per essere indotta, e non viene modificata dal patogeno stesso. Ne fanno parte:

- le barriere fisiche e chimiche, come gli epiteli e le mucose con le sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici cellulari;
- i monociti macrofagi, le cellule dendritiche, i granulociti polimorfonucleati (neutrofili, eosinofili, basofili), i mastociti, le cellule NK (Natural Killer);
- le proteine del sangue, come i fattori del complemento e mediatori della flogosi;
- proteine, dette citochine, che regolano le attività delle cellule dell'immunità innata [2,3].

Un limite di questa risposta è rappresentato dal fatto che nei confronti del ripetersi di una stessa infezione i meccanismi dell'immunità innata rispondono sempre in egual modo. Tuttavia essa costituisce il primo ed imprescindibile baluardo nella difesa contro agenti patogeni, capace di prevenire l'infezione e in molti casi di eliminare i microrganismi. I meccanismi effettori dell'immunità innata vengono spesso utilizzati anche nell'ambito delle risposte specifiche, che sono così stimulate e rese maggiormente efficaci. Le barriere fisiche e chimiche sono costantemente in funzione, addirittura anche prima dell'infezione, mentre i fagociti e il complemento sono normalmente inattivi ma pronti ad una rapida attivazione in presenza di microbi. Le citochine sono proteine sintetizzate dalle cellule dell'immunità sia innata che adattativa in risposta agli antigeni che, una volta secrete, sono capaci di regolare molte delle funzioni svolte dalle stesse cellule che le hanno prodotte. Hanno il ruolo di molecole segnale per le cellule del SI e svolgono diverse funzioni a seconda del target cellulare. Una stessa funzione può essere svolta da citochine diverse

(ridondanza). Ciascuna citochina possiede un proprio recettore attraverso il quale innesca una serie di segnali intracellulari. Le citochine svolgono un ruolo importante anche su cellule che non appartengono al SI, come quelle endoteliali ed epiteliali. Attualmente sono state identificate 84 citochine: 34 interleuchine (IL) e 50 chemochine. Le chemochine sono citochine ad attività chemotattica implicate nella migrazione di leucociti ed altre cellule oltre che nella proliferazione cellulare. Hanno un peso molecolare compreso tra 6 e 14 kDa ed i loro recettori possiedono 7 domini transmembrana. Le chemochine si dividono in omeostatiche (regolano la migrazione dei precursori verso gli organi linfoidi secondari) ed infiammatorie (prodotte in risposta a stimoli infiammatori con l'obiettivo di richiamare nella sede d'infezione le cellule dell'immunità).

La risposta immunitaria innata può essere divisa in tre parti: fase di riconoscimento, fase di attivazione, fase effettrice.

I componenti di questa branca dell'immunità riconoscono specifiche strutture dei microrganismi che non sono espresse dalle cellule dell'individuo. Tali bersagli microbici si definiscono PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), ed i recettori che li riconoscono sono detti nel loro insieme PRR (pattern recognition receptors). Classi di microrganismi diversi esprimono PAMPs diversi, riconosciuti da PRR diversi. Poiché spesso i PAMPs sono strutture essenziali alla sopravvivenza dell'agente infettivo, quindi altamente conservate, assicurano un riconoscimento certo da parte delle cellule esprimenti PRR [2]. I PRRs sono suddivisi in tre grandi gruppi:

- *Toll-like receptors (TLR)*= Glicoproteine di membrana costituite da una porzione extracellulare ricca di leucine ed una citoplasmatica omologa a

quella dell'IL-1R. Agendo tramite l'attivazione di determinate chinasi che, in seguito alla dimerizzazione di quattro proteine, agiscono su fattori trascrizionali quali NF- κ B, IRF-3 e IRF-7, fungono da importanti mediatori dell'infiammazione inducendo la produzione di alcune citochine. Svolgono anche un ruolo fondamentale all'interno dell'immunità acquisita.

- *C-type lectins receptors*= Divisi in proteine solubili oppure transmembrana, sono caratterizzati da un dominio legante carboidrati Ca^{2+} dipendente: sono coinvolti nell'up-take del patogeno da parte dei fagociti.
- *Scavenger receptors*= Noti anche come "recettori spazzino", sono coinvolti nell'up-take di ligandi polianionici e nel riconoscimento di strutture molecolari appartenenti sia ai Gram- che ai Gram+.

1.3 Immunità adattativa

L'immunità adattativa è la seconda linea di difesa contro le infezioni, è presente nei vertebrati e raggiunge il massimo grado di completezza nei mammiferi. È costituita da componenti del sistema immunitario attivate dall'esposizione ad agenti esterni in virtù di fini sistemi di riconoscimento. Inoltre l'immunità acquisita si caratterizza per la capacità di "ricordare" e di attuare la sua risposta difensiva in maniera sempre più vigorosa ed efficace ad esposizioni ripetute ad uno stesso microrganismo; possiamo quindi affermare che la specificità nei confronti dei diversi antigeni e la memoria immunitaria sono peculiari della risposta specifica [1,2]. L'immunità adattativa è costituita dai linfociti e dai loro prodotti e viene detta anche "specificità" per la sua capacità di distinguere fra vari antigeni, cioè sostanze che inducono una risposta caratteristica.

L'immunità acquisita segue temporalmente la risposta immunitaria innata ed esistono due tipi di risposte immunitarie adattative, mediate da cellule e molecole diverse e volte all'eliminazione di tipi diversi di microbi:

- immunità *umorale*
- immunità *cellulo-mediata*,

L'immunità umorale è mediata da molecole prodotte e secrete dai linfociti B dette anticorpi (Ab) o immunoglobuline (Ig). Queste sono capaci di riconoscere gli antigeni microbici e neutralizzarne l'infettività, oltre a identificarli per l'eliminazione da parte dei meccanismi effettori. La risposta umorale rappresenta il principale meccanismo di protezione contro i patogeni extracellulari e le loro tossine. Gli Ab sono proteine costituite da due catene leggere e da due catene pesanti, entrambe formate da una regione costante, che definisce la classe dell'Ab, e da una regione variabile, che definisce la specificità per l'antigene. Esistono cinque classi di Ig, caratterizzate in base al frammento costante della catena pesante: IgM, IgG, IgA, IgD ed IgE. La frazione costante della catena leggera può invece essere di tipo κ o λ .

L'immunità cellulare, è invece mediata dai linfociti T (timo-dipendenti). Essa orchestra la difesa nei confronti di virus e patogeni intracellulari ed inoltre è responsabile del coordinamento delle varie risposte immunitarie. Sia i linfociti T che i linfociti B derivano da un precursore staminale multipotente di origine midollare; la linea cellulare B differenzia a livello del midollo osseo, mentre i linfociti T immaturi migrano e completano il processo di differenziazione e maturazione a livello del timo. I linfociti T e B, a differenza delle cellule dell'immunità innata, sono caratterizzati dalla presenza di recettori di superficie specifici per il riconoscimento di un singolo determinante antigenico e questi sono rappresentati rispettivamente dal TCR (T cell

receptor) e dal BCR (B cell receptor). Il recettore antigenico dei linfociti B (BCR) è in grado di legare antigeni solubili nella loro forma nativa, mentre il TCR è capace di riconoscere peptidi derivanti dalla processazione degli antigeni proteici [2,3] effettuata da cellule specializzate (APC, antigen presenting cells). Queste cellule “presentano” l’antigene processato associato a proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [4] del quale esistono due forme: MHC di classe I e MHC di classe II. Le molecole MHC di classe I sono espresse da tutte le cellule nucleate dell’organismo e vengono associate ad antigeni di provenienza endocellulare mentre le molecole MHC di classe II sono espresse solamente dalle cellule APC professionali, quali le cellule dendritiche, le cellule di Langherans, i linfociti B, i monociti e macrofagi. Queste molecole sono associate a peptidi antigenici provenienti dalla fagocitosi e dalla degradazione enzimatica lisosomiale (processing) di molecole antigeniche extracellulari. I linfociti T maturi circolanti sono distinguibili fenotipicamente in due sottopopolazioni in base alla presenza di specifiche molecole di superficie:

- **linfociti CD4⁺**, detti linfociti T helper, per la loro capacità di indurre i linfociti B a produrre anticorpi [2,5], ed attivare altri tipi cellulari con proprietà fagocitarie (macrofagi e granulociti), e citolitiche (cellule NK e linfociti T CD8⁺)
- **linfociti CD8⁺**, detti citotossici per il loro potenziale citolitico ovvero la capacità di lisare le cellule bersaglio [2,5].

Il TCR dei linfociti T CD4⁺ riconosce il complesso MHC-II/peptide mentre nei linfociti T CD8⁺ il TCR riconosce in modo selettivo il complesso MHC-I/peptide. I linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ si differenziano oltre che per l'espressione selettiva delle due molecole di superficie, anche per le diverse capacità funzionali [6,7].

Caratteristiche importanti dell'immunità adattativa sono dunque:

- **specificità**: epitopi antigenici diversi evocano risposte diverse;
- **diversificazione**: consente al SI di rispondere ad una vasta gamma di antigeni;
- **non reattività al self**: previene il danneggiamento dell'organismo reagendo solo verso antigeni estranei [8,9];
- **specializzazione**: genera risposte ottimali per contrastare vari tipi di patogeno;
- **auto-limitazione**: la risposta si esaurisce nel tempo per evitare danni all'organismo;
- **memoria**: l'esposizione ad un dato antigene aumenta la capacità del SI di rispondervi in futuro.

La non reattività verso gli antigeni self prende il nome di tolleranza immunologica ed è la capacità del sistema immunitario di non rispondere nei confronti di antigeni propri dell'organismo. Essa si realizza sia a livello degli organi linfoidei primari (tolleranza centrale) e corrisponde alla selezione negativa (si eliminano tutti i linfociti che rispondono ad antigeni self), sia a livello di organi linfoidei secondari (tolleranza periferica), attraverso l'invio di segnali di inattivazione o apoptosi a quei linfociti che si sono attivati dopo il riconoscimento di antigeni self. La mancanza della tolleranza verso il self porta allo sviluppo di patologie autoimmunitarie [10].

1.4 I linfociti T e i meccanismi effettori

I linfociti T si attivano e differenziano in seguito al riconoscimento di peptidi antigenici presentati dalle molecole MHC espresse dalle APC, espletando poi le loro funzioni effettrici attraverso segnali di membrana e produzione di citochine.

Essi possono esprimere sulla loro superficie il CD4 o il CD8, molecole

definite corecettori attraverso le quali si identificano le sottopopolazioni linfocitarie, e le molecole del complesso TCR (CD3 e le catene del complesso stesso). Il recettore dei linfociti T o **TCR** è un complesso eterodimerico formato da una catena α e da una β , la cui funzione è quella di riconoscere il complesso MHC-peptide [2]. Associato al TCR troviamo il complesso molecolare composto dal **CD3**, coinvolto nella trasduzione di alcuni segnali innescati dall'interazione del TCR con l'antigene. Una minoranza di linfociti T esprime sulla loro superficie un secondo tipo di TCR formato da una catena γ e una catena δ che sebbene strutturalmente simili alle catene α e β presenta una differente specificità. I recettori TCR γ/δ , infatti, sembrano essere specializzati nel riconoscimento di particolari tipi di ligandi, come lipidi ed altri antigeni non peptidici, che vengono presentati da molecole diverse rispetto ai complessi MHC di classe I o II. Le cellule T $\gamma\delta$ sono spesso presenti negli epitelii ma ancora non sono chiari il ruolo e la funzione biologica svolti da questi recettori. Il processo di maturazione dei linfociti T a livello del timo è caratterizzato da diversi stadi nei quali si possono osservare riarrangiamenti genici e cambiamenti nell'espressione di molecole di superficie. Infatti negli stadi più precoci di maturazione si identifica un'altra popolazione linfocitaria che non esprimendo né il CD4, né il CD8 è definita "doppio negativa" (CD3+CD4-CD8-). La distribuzione dei linfociti CD3+CD4-CD8- non è limitata solo al timo, dal momento che ne è stata dimostrata la presenza anche a livello del sangue periferico dove infatti circa l'1%-3% dei linfociti CD3+ esprime il TCR α/β ma sono CD4- e CD8-. Si è inoltre dimostrato l'importante ruolo di questa popolazione linfocitaria

nella down regolazione della risposta immunitaria [11]. I linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ si differenziano oltre che per l'espressione selettiva delle due molecole di superficie, anche per le diverse capacità funzionali [6,7]. I linfociti T CD4⁺ rispondono ad antigeni presenti nelle vescicole endosomiali delle APC e presentati su MHC II; i T CD8⁺ rispondono a microbi presenti nel citosol delle cellule infettate, i cui antigeni sono esposti su MHC I. Il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR deve essere sostenuto da dei segnali di costimolo, come il legame della molecola CD28 dei T ad uno dei suoi ligandi, **CD80** e **CD86**, espressi dalla APC. A seguito di questa attivazione **il linfocita attiva la produzione di IL-2**, un fattore di crescita autocrino, che permette l'espansione clonale, dando origine ad una progenie di linfociti T tutti specifici per lo stesso antigene. Dopo aver proliferato in risposta alla IL-2, i linfociti CD8⁺ si differenziano in CTL, capaci di riconoscere e uccidere cellule che esprimono l'antigene specifico. I CTL sviluppano infatti granuli citoplasmatici contenenti proteine come perforina e granzimi, capaci di lisare le cellule bersaglio. I linfociti CD4⁺ invece differenziano in sottopopolazioni di cellule effettrici distinte.

1.5 I linfociti T CD4⁺

I linfociti T CD4⁺ rappresentano una eterogenea famiglia di cellule che giocano un ruolo importante sia nella protezione dell'organismo che nell'immunopatologia. Le cellule CD4⁺ sono importanti per amplificare la risposta immunitaria attivando cellule effettrici con proprietà fagocitiche e citolitiche come macrofagi, granulociti e cellule NK e reclutando altre cellule

del sistema immunitario a livello della zona del danno. Da un punto di vista fisiologico possono essere suddivise in due categorie: le CD4+ **effettrici**, che proteggono da agenti infettivi esogeni, e le CD4+ **regolatorie**, che proteggono dalle malattie autoimmuni e inibiscono la risposta immunitaria quando può diventare dannosa per l'organismo.

Alla prima categoria appartengono i linfociti T helper, così chiamati perché inducono la produzione di specifici anticorpi da parte dei linfociti B a seguito della secrezione di citochine e segnali trasmessi tramite molecole di membrana. Per molto tempo, a partire dalla loro scoperta negli anni '80, si è ritenuto che esistessero due tipi principali di cellule T CD4+ effettrici, indicate come T helper 1 (**Th1**) e T helper 2 (**Th2**) [12,13] distinguibili chiaramente sulla base del tipo di citochine prodotte, importanti sia per le funzioni effettrici che per lo sviluppo e l'espansione [14]. Più recentemente è stato identificato un nuovo tipo di cellule T CD4+ effettrici, definite come **Th17** [15]. Per la descrizione dettagliata delle suddette popolazioni si rimanda ai paragrafi seguenti.

Oltre a queste tre sottopopolazioni, alla categoria delle cellule T CD4+ effettrici appartiene anche un particolare fenotipo di cellule T helper definite follicolari (**Tfh**), che si differenzia come gli altri a seguito dell'attivazione di precursori Th naïve CD4+. Come per le altre popolazioni T helper, specifiche citochine indirizzano il pattern di espressione genica implicato nel differenziamento in senso Tfh. A guidare l'acquisizione del fenotipo Tfh sono principalmente la IL-6 e la IL-21, che promuovono l'attivazione di STAT3 e l'espressione del repressore trascrizionale Bcl6

(considerato il principale regolatore dello sviluppo dei Tfh in vivo) [16-18] sebbene anche altri fattori di trascrizione partecipino con funzioni regolatorie sul loro differenziamento [19]. Le cellule T helper follicolari sono regolatori chiave della formazione dei centri germinativi e dell'immunità umorale a lungo termine dipendente dalle cellule T [19]. Identificati per la prima volta come cellule T CD4+ localizzate nei centri germinativi delle tonsille umane, le cellule Tfh esprimono elevati livelli di CXCR5 (recettore 5 delle chemochine), ICOS e PD1, che si associano ad una downregolazione del CCR7 e dell'IL2R α [20], BTLA, CD40L, e la proteina SAP [19]. Queste molecole sono importanti per la migrazione dei linfociti Tfh verso i follicoli di cellule B e per fornire segnali che portano all'attivazione e al mantenimento delle risposte cellulari B nei centri germinativi [21, 22].

Alla categoria di cellule T CD4+ con funzioni regolatorie appartengono invece i linfociti **T regolatori**, che devono il proprio nome all'attività regolatrice che svolgono nelle risposte immunitarie e nella prevenzione dall'autoimmunità, contribuendo a mantenere la tolleranza nei confronti del self. Identificati per la prima volta a metà degli anni novanta da Sakaguchi e collaboratori in modelli murini [23], Annunziato et al. ne hanno in seguito evidenziato la presenza anche nell'uomo, sia a livello del timo che del sangue periferico [24]. I linfociti T regolatori rappresentano il 2-5% di tutte le cellule T CD4+ periferiche e sono caratterizzati dall'espressione costitutiva del CD25, catena α del recettore dell'interleuchina-2 (IL-2R α) che viene comunemente utilizzato come marker specifico [25]. Gli alti livelli

di espressione di tale marker consentono alle Treg di sequestrare la IL-2 e impedire così la proliferazione delle cellule effettrici [26]. Il fattore di trascrizione principale coinvolto nella loro funzione regolatoria è il Foxp3 (Forkhead box P3), che risulta espresso ad alti livelli e la cui ablazione comporta l'insorgenza di malattie autoimmuni ed infiammatorie croniche gravi sia nel topo che nell'uomo [27]. Tale gene è di fatto coinvolto sia nello sviluppo dei Treg sia nell'espletamento della loro funzione immunosoppressiva [28]. Una ridotta funzionalità dei linfociti T reg si traduce in una maggiore suscettibilità alle patologie autoimmuni [29].

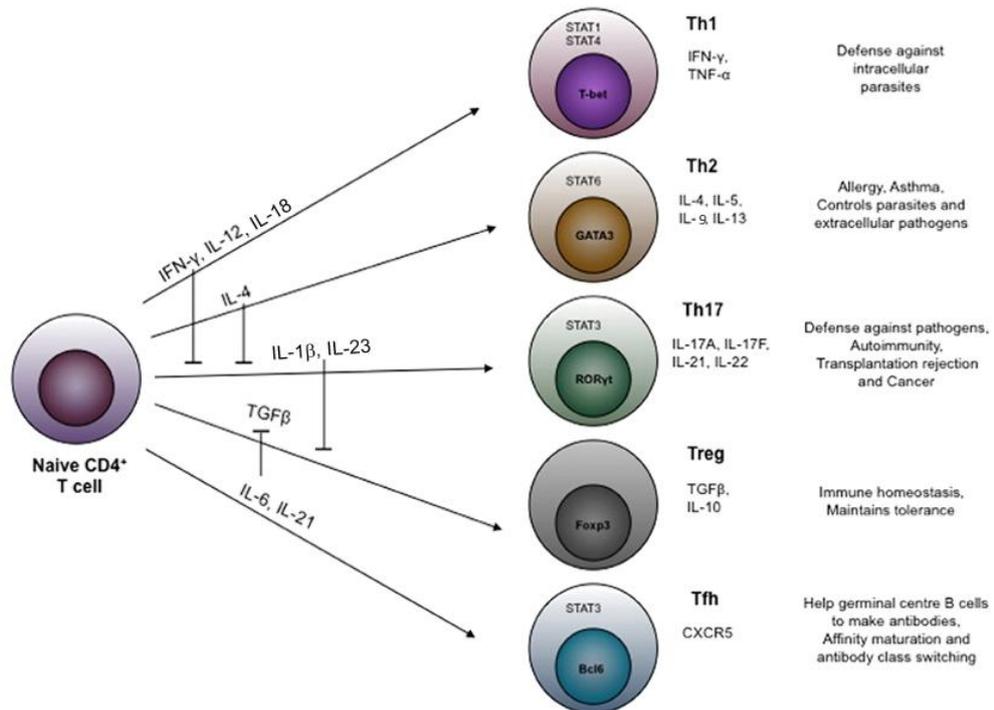


Fig. 1: Popolazioni linfocitarie T CD4⁺

1.5.1 I linfociti Th1

Le cellule *Th1* presentano come specifici marcatori di superficie **CXCR3** e **CCR5** e sono caratterizzate dalla produzione di **IFN γ** [14], che ne promuove la differenziazione e inibisce la proliferazione delle altre sottoclassi. La differenziazione in senso Th1 avviene in risposta a microrganismi che infettano o attivano i macrofagi e le cellule NK. Questo determina l'attivazione dell'immunità innata, con produzione di IL-18 e IL-12 da parte delle cellule APC. La IL-18 stimola le cellule NK a produrre IFN γ , che va ad agire sulle cellule T naïve stimolandole ad esprimere anche la catena β (già esprimono la catena α) del recettore dell'IL-12. Le cellule T naïve sono così capaci di rispondere all'**IL-12** prodotta dalle cellule APC che ne favorisce la polarizzazione in senso Th1 [30,31]. Alcuni microbi attivano i TLRs espressi dai macrofagi e dalle cellule dendritiche innescando direttamente la produzione di IL-12 da parte di queste cellule. Le cellule T possono inoltre potenziare la produzione di IL-12 per mezzo del CD40L di membrana, che legando il CD40 espresso dalle APC stimola la trascrizione del gene dell'IL-12. Quest'ultima lega i recettori espressi dai linfociti T CD4+ stimolati e attiva il fattore di trascrizione **STAT4** che favorisce la differenziazione in senso Th1. La produzione di IFN- γ attiva a sua volta la sintesi di un altro fattore di trascrizione, **T-bet**, che amplifica la risposta di tipo 1. La principale funzione dei linfociti Th1 è la difesa mediata dai fagociti contro le infezioni, in particolare verso parassiti intracellulari. L'IFN- γ stimola l'attività microbica dei fagociti, promuovendo così l'uccisione dei microbi fagocitati. I macrofagi infatti aumentano la produzione di prodotti microbicidi come gli intermedi reattivi dell'ossigeno, l'ossido di azoto e gli enzimi lisosomiali. Tramite il CD40L i linfociti Th1 sono in grado di legare il CD40 espresso dai linfociti B inducendo la produzione di **IgM e IgG**, grazie anche a IL-2 e

IFN- γ [32,33]. L'azione dei linfociti Th1 è pertanto coinvolta nella risposta contro i patogeni intracellulari e nelle reazioni da ipersensibilità di tipo ritardato. Nel caso in cui l'antigene riconosciuto dai linfociti Th1 appartenga al self si scatenano risposte autoimmunitarie, col SI che attacca tessuti dell'organismo. Fino a qualche tempo fa si credeva che i linfociti Th1 fossero i principali responsabili dello sviluppo delle malattie autoimmuni ma oggi sappiamo che un ruolo importante è svolto anche dalle cellule Th17.

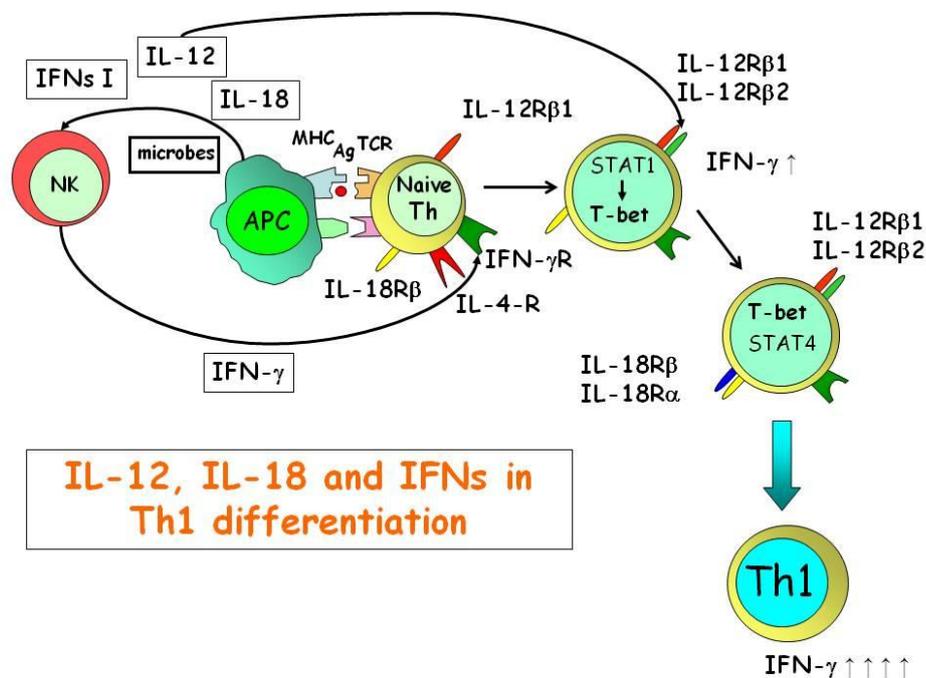


Fig. 2: Meccanismo di differenziazione Th1

1.5.2 I linfociti Th2

Le cellule *Th2* sono caratterizzate dalla produzione di Interleuchina-4 (IL-4), IL-5, IL-9 e IL-13 [14,34,35] ed esprimono come marcatori tipici di superficie CRTH2 e CCR4. Le cellule Th2 derivano dagli stessi precursori dei linfociti Th1, i linfociti CD4+ naïve, il cui

profilo di polarizzazione è condizionato però da stimoli diversi presenti nelle prime fasi della risposta immunitaria. La differenziazione in senso Th2 dipende dall'**IL-4**, che attiva il fattore di trascrizione **STAT6** [30,31]. Altro fattore di trascrizione importante nello sviluppo Th2 è **GATA-3** che attiva direttamente i geni che codificano per IL-5 e IL-13 ed è coinvolto nel rimodellamento della cromatina nei loci relativi ai geni delle citochine Th2 [36-38]. GATA-3 può essere prodotto in risposta al riconoscimento dell'antigene, e la sua produzione potenziata dall'IL-4. L'IL-4 prodotta inizialmente, che indirizza verso la linea Th2, si pensa sia prodotta da tutte le cellule T CD4+ stimulate. Nel caso in cui non si scateni una risposta infiammatoria con produzione di IL-12, tale produzione viene intensificata così da favorire il fenotipo di tipo 2. Secondo un altro modello la produzione iniziale di IL-4 è sostenuta da mastociti, eosinofili e basofili, che vanno così a polarizzare la cellula T naïve verso il fenotipo Th2 [39]. Le funzioni effettrici dei linfociti Th2 sono le reazioni immunitarie mediate da eosinofili e mastociti. Le cellule Th2 sono responsabili della difesa contro le infestazioni da elminti, parassiti e, qualora la risposta Th2 sia alterata, delle reazioni allergiche. La risposta linfocitaria di tipo Th2 si rende necessaria quando l'agente estraneo non può essere eliminato efficacemente e senza danno tissutale da una risposta Th1, nei casi quindi in cui l'agente sia troppo grande per essere fagocitato e più resistente all'attività microbica dei macrofagi come nel caso di parassiti ed elminti. Tramite il CD40L i linfociti Th2 interagiscono col CD40 espresso dai linfociti B, attivandoli. La contemporanea produzione di IL-4 e IL-13 stimola la produzione di **IgE** da parte dei linfociti B con la funzione di opsonizzare gli elminti [40]. L'IL-5 attiva gli eosinofili, che si legano alle IgE presenti sugli elminti grazie a recettori per il frammento costante delle IgE (Fcε) e rilasciano il contenuto dei loro granuli, tra cui la proteina basica e la

proteina cationica maggiore, capaci di intaccare il robusto tegumento di questi parassiti [41-45]. Poiché anche i mastociti esprimono recettori Fcε, al contatto con antigeni opsonizzati da IgE rilasciano il contenuto dei loro granuli (degranolazione), principalmente costituito da amine vasoattive (come l'istamina), citochine infiammatorie (come il TNF) e mediatori lipidici. IL-9 e IL-13 agiscono anche a livello delle mucose stimolando la produzione di muco. I linfociti Th2 sono inoltre capaci di ostacolare l'attività macrofagica grazie all'IL-4 che in associazione con la IL-13 antagonizza l'azione dell'IFN-γ, citochine che invece hanno attività stimolatoria sui linfociti Th2 stessi.

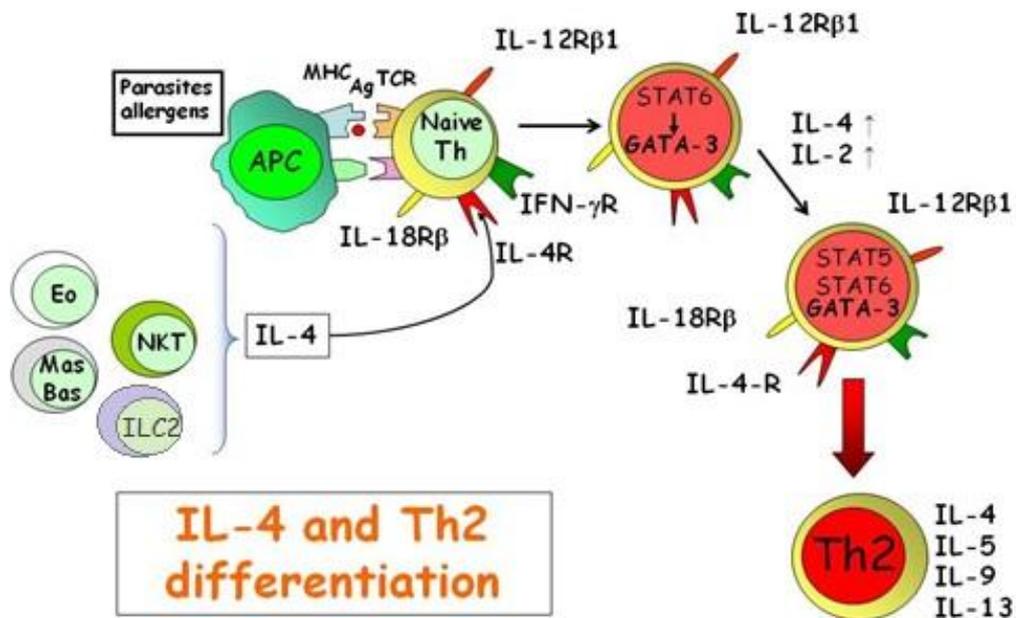


Fig. 3: Meccanismo di differenziazione Th2

Altre citochine sono prodotte da entrambi i tipi cellulari, quali TNF-α, IL-3, IL-6, e IL-10. Esistono inoltre cellule T capaci di produrre

contemporaneamente citochine di tipo Th1 e Th2, che sono state definite linfociti Th0.

Le due popolazioni Th1 e Th2 condividono gli stessi precursori, i linfociti T CD4⁺ naïve, e la differenziazione verso una sottopopolazione piuttosto che verso l'altra è condizionata dagli stimoli presenti nel microambiente durante le prime fasi della risposta immunitaria [30]. Tra gli stimoli più importanti che inducono la differenziazione verso il fenotipo Th1 vi è la IL-12, mentre l'IL-4 promuove la differenziazione in senso Th2 [30,31]; comunque anche altri fattori come la concentrazione dell'antigene e segnali di membrana sono coinvolti nel processo differenziativo dei linfociti T CD4⁺.

La perdita del controllo della risposta di tipo effettrice Th1 può portare all'insorgenza di patologie autoimmuni; le cellule Th1 infatti hanno un alto potere pro-infiammatorio e sono coinvolte nella patogenesi e progressione di tali malattie. Tuttavia, topi deficienti per la citochina IFN- γ o per il suo recettore, non presentano resistenza all'induzione di patologie autoimmuni. Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare l'esistenza di un'ulteriore sottopopolazione di linfociti T helper, capace di indurre infiammazione tissutale ed autoimmunità: è stato così identificato il fenotipo Th17, costituito da linfociti T CD4⁺ capaci di produrre la citochina pro-infiammatoria IL-17 [46].

1.5.3 I linfociti Th17

Le prime evidenze circa l'esistenza di una nuova sottopopolazione funzionale di linfociti T helper derivano dall'osservazione che in vitro in presenza di *Borrelia burgdorferi* [46] veniva prodotta IL-17 da parte di linfociti T helper indipendentemente dalla produzione di citochine di tipo Th1 o Th2. Tuttavia i risultati più importanti sull'esistenza dei linfociti Th17 e sul loro ruolo patogenetico nelle malattie autoimmuni sono stati ottenuti su modelli murini di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) e di artrite collagene-indotta (CIA) [47,48].

La IL-17 appartiene ad una famiglia di citochine ad azione pro-infiammatoria comprendente l'IL-17 A, B, C, D, E, F [49,50,51]. La IL-17 ha un effetto pleiotropico su diversi elementi cellulari che le consente di coordinare la risposta infiammatoria inducendo l'espressione di citochine (come IL-6 e TNF- α), chemochine (come MCP-1 e MIP-2) e metalloproteasi implicate nell'infiltrazione e la distruzione tissutale [52]. Questa citochina è inoltre coinvolta nella proliferazione, maturazione e chemiotassi dei neutrofili [53]. In vivo, è stato osservato che topi deficitari per IL-17R sono più suscettibili ad infezioni batteriche polmonari a causa del ridotto reclutamento in sede dei neutrofili [54]; al contrario, un'aumentata produzione di IL-17 a livello polmonare provoca infiammazione tissutale [55]. Inoltre, topi privi di IL-17 o trattati con un antagonista del recettore dell'IL-17, sono resistenti all'artrite indotta da adiuvanti e sviluppano una forma meno grave di EAE [56,57]. Nel topo è stato osservato che i linfociti Th17 originano da cellule T CD4⁺ naïve in presenza di IL-6 e TGF- β , e che il loro sviluppo è stabilizzato e/o amplificato dalle citochine IL-23 e IL-21. La IL-23 appartiene ad una famiglia di citochine eterodimeriche di cui fa parte anche la IL-12; è costituita dalla catena p40, uguale a quella della IL-12, e dalla catena p19, espressa

selettivamente dalla IL-23. Il recettore della IL-23 è un recettore eterodimerico composto dalle subunità IL-12R β 1 e IL-23R [58]. Poiché la IL-23 condivide con la IL-12 sia la catena p40 che la subunità recettoriale IL-12R β 1, inizialmente fu ipotizzato un suo ruolo nella risposta Th1. Tuttavia, topi deficienti per la catena p19 della IL-23 avevano una normale risposta Th1 mostrando, piuttosto, un difetto della produzione di IL-17 [59]. E' stato inoltre dimostrato che la IL-23 espande la popolazione Th17 all'interno del pool delle cellule T memory, stabilizzandone il fenotipo [59]. A conferma di questi dati vi è l'osservazione che topi geneticamente modificati con una delezione del gene per il recettore dell'IL-1 β (IL-1R) mostravano una carenza di linfociti Th17 e sviluppavano resistenza all'EAE.

Un'altra caratteristica distintiva dei linfociti Th17 è rappresentata dal fatto che queste cellule esprimono il fattore di trascrizione ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor γ t) [60,61], a differenza dei linfociti Th1 (che esprimono STAT1, STAT4 e T-bet) e Th2 (che esprimono STAT6 e GATA3). In studi precedenti si era osservato che linfociti T CD4+ derivanti da topi deficitari per i fattori di trascrizione specifici per i Th1 e Th2 erano capaci, in vitro, di differenziare nel fenotipo Th17 se attivati in presenza di IL-23 [62,63]. Inoltre, la differenziazione dei linfociti Th17, in topi mancanti dei suddetti fattori trascrizionali, dopo immunizzazione, è risultata normale, suggerendo un mancato coinvolgimento di tali fattori nell'induzione verso la sottopopolazione Th17. ROR γ t è espresso, oltre che dai linfociti Th17, anche da alcune cellule ematopoietiche (le cellule fetali e i precursori linfocitari coinvolti nella formazione dei linfonodi e della placca di Peyer, i timociti immaturi). La delezione di ROR γ t in modelli animali determina il mancato sviluppo dei linfociti Th17, mentre l'uso di un vettore retrovirale codificante per ROR γ t ne induce un incremento.

I linfociti Th17 umani si caratterizzano per l'espressione di alcune molecole, quali IL-23R e RORC, che non sono espresse dalle cellule Th1, ma possiedono anche markers a comune come IL-12R β 2 and T-box 21 (TBX21) [64]. Inoltre le cellule Th17 umane si differenziano da precursori naïve CD4+ in presenza di IL-1 β e IL-23, senza la necessità del TGF- β , che svolge soltanto un ruolo di inibizione dello sviluppo del fenotipo Th1 [65].

Recentemente è stato dimostrato che i linfociti Th17 umani esprimono il CD161+ (o NKR-P1A) come marker di membrana, sia a livello del sangue periferico che dei tessuti infiammati. Inoltre sono stati individuati i precursori T naïve CD4+CD161+ presenti nel sangue di cordone ombelicale e nel timo neonatale [66]. Il ruolo nell'omeostasi linfocitaria del CD161, il cui ligando è stato identificato nel lectin-like transcript 1 [67], non è completamente noto, anche se è ipotizzabile che sia coinvolto nella migrazione trans-endoteliale [68,69]. È dunque ipotizzabile che queste molecole rivestano un ruolo importante nel consentire la migrazione delle cellule Th17 effettrici nei tessuti, dove queste sono richiamate in risposta al legame della chemochina CCL20 al suo recettore CCR6 (molecola di membrana associata al fenotipo Th17) [64,70].

In uno studio precedentemente condotto da Annunziato e collaboratori [64], si è visto che nell'uomo esistono, nel sangue e nei tessuti, cellule capaci di produrre sia IFN- γ che IL-17 (Th1/Th17). È stato inoltre dimostrato che i linfociti Th17 e Th1/Th17 esprimono entrambi i fattori di trascrizione RORC e T-bet e che possono essere indotti verso il fenotipo Th1 con l'aggiunta di IL-12 (effetto che può essere parzialmente antagonizzato dall'IL-23) suggerendo una certa flessibilità delle cellule Th17 umane e la loro possibile origine comune ai linfociti Th1 [64].

Questi linfociti Th1, derivati da cellule Th17, esprimono inoltre il **CD161** e sono caratterizzati anche dall'elevata espressione di **IL-17RE**, **CCR6** (recettore per le chemochine), **IL-1RI**, **IL-23R**, e vengono definiti "**Th1 non classici**" in contrapposizione ai linfociti Th1 classici, non appartenenti al lineage Th17, negativi per i marcatori soprariportati ma positivi per T-bet e CXCR3. L'utilizzo di questo pannello di marker consente di distinguere e identificare le due sottopopolazioni cellulari [66]. Nel sangue periferico di soggetti sani i linfociti Th17 costituiscono solo l'1-2% dei linfociti T. Questa bassa frequenza si mantiene anche, rispetto ai Th1 classici nei tessuti e nei fluidi di pazienti con patologie autoimmuni o infiammazioni croniche, probabilmente a causa della forte plasticità ampiamente descritta dalla letteratura scientifica degli ultimi anni circa il fenotipo Th17 [66]. In condizioni di flogosi è stata infatti evidenziata la polarizzazione verso il fenotipo Th1 non classico e ciò potrebbe dare spiegazione della rarità dei Th17 nei fluidi biologici di suddetti pazienti.

La caratterizzazione fenotipica e funzionale dei linfociti Th17 e delle cellule da loro derivate ha permesso di comprendere meglio il loro ruolo in patologie autoimmuni e infiammazioni croniche che prima erano attribuite alla sola popolazione Th1 [71,72].

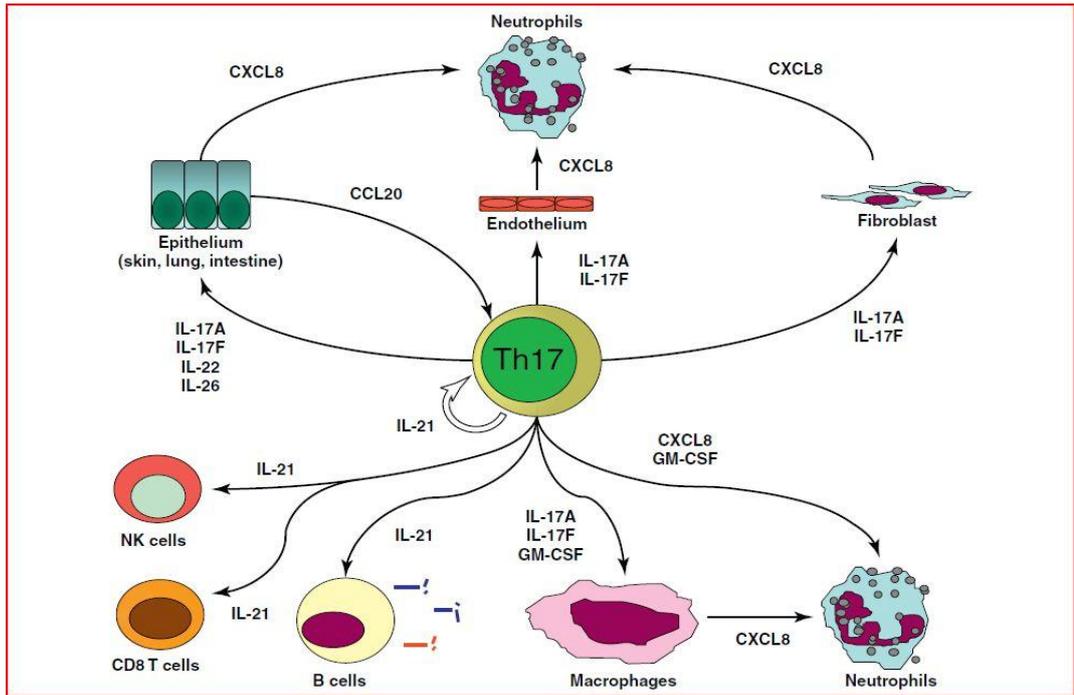


Fig. 4: Citochine e chemochine prodotte dai Th17 ed i loro bersagli [71]

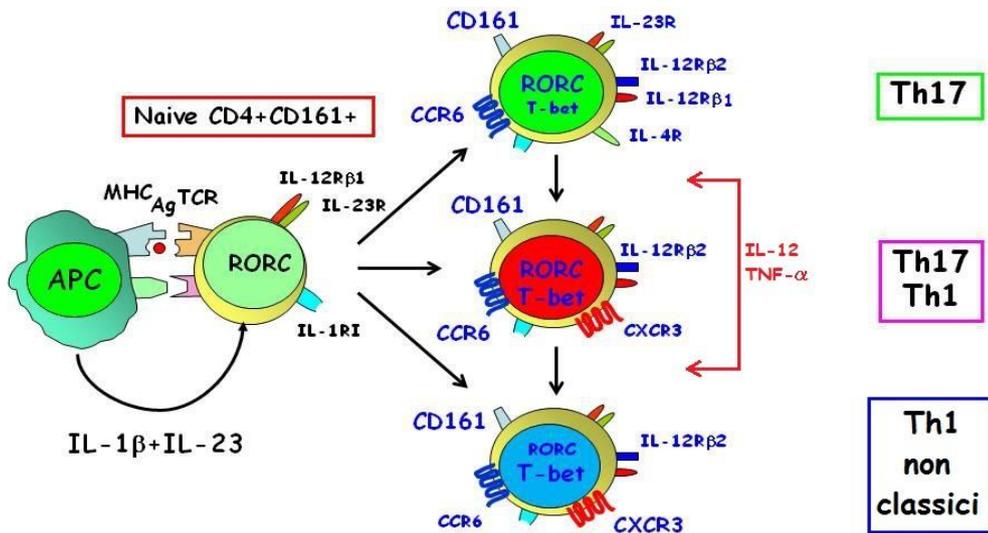


Fig. 5: Meccanismo di differenziazione Th17 nell'uomo e loro plasticità [66]

1.6 Ruolo dei linfociti Th1 e Th17 nella patogenesi di malattie autoimmuni

La scoperta e la successiva caratterizzazione del subset linfocitario Th17 nei modelli sperimentali murini, ha evidenziato un loro ruolo nelle malattie autoimmuni, inducendo a pensare che i linfociti Th1 non fossero i soli responsabili nello sviluppo di tali patologie. Infatti, il ruolo dei linfociti Th17, Th17/Th1 e dei Th1 nella patogenesi di tali malattie è ancora oggi intensamente dibattuto.

È stato infatti dimostrato che le cellule Th17 sono coinvolte in forme di EAE caratterizzate da prevalente infiltrazione di granulociti, mentre i linfociti Th1 sono i principali responsabili in forme di EAE a prevalente infiltrazione di cellule mononucleate [73]. Inoltre, nell'uveite autoimmune sperimentale entrambi i subset cellulari risultano essere patogenici [74], mentre è stato riscontrato che né la IL-17A né la IL-17F contribuiscono alla neuro-infiammazione autoimmune in modelli murini [75]. Studi recenti hanno evidenziato che nella colite indotta da *Helicobacter hepaticus* l'IFN- γ , ma non la IL-17, gioca un ruolo nella patogenesi della malattia in assenza delle cellule Treg [76].

Ad oggi, inoltre, sono presenti in letteratura dati che indicano un possibile coinvolgimento dei linfociti Th17 nella patogenesi delle malattie autoimmuni e infiammatorie croniche dell'uomo. Infatti è stata osservata nella mucosa intestinale di soggetti affetti da Morbo di Crohn la presenza di un infiltrato linfocitario, nel quale abbondano i linfociti Th17 [64]. Inoltre, è stato dimostrato a livello del fluido cerebrospinale e del sangue periferico da pazienti affetti da sclerosi multipla un'alta espressione di mRNA codificante per IL-17 [70]. È stata anche riscontrata la presenza di IL-17 nel siero e in biopsie di tessuti flogistici in soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico [77] e da sclerosi sistemica [78], nel siero e nelle biopsie di

patologie infiammatorie della vescica [79,80] e nell'epidermide di pazienti con dermatite da contatto e psoriasi [81]. Infine la IL-17 e la IL-23p19 sono presenti a livelli più alti nel siero, nel fluido e nelle biopsie sinoviali di pazienti con artrite reumatoide (RA) rispetto a pazienti affetti da osteoartriti [82,83]; è anche noto che l'IL-17 determina un aumento dell'espressione di RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) sui condrociti e gli osteoblasti, promuovendo così lo sviluppo degli osteoclasti che sono i principali responsabili dell'erosione dell'osso in caso di RA [84].

1.7 Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è un fenomeno che comprende precisi eventi biologici organizzati e regolati da diverse reazioni biochimiche. Nella sua complessità il ciclo cellulare determina, in seguito ad uno stimolo mitogenico, la duplicazione del materiale genetico e l'organizzazione di tutti i fenomeni molecolari e morfologici che portano alla divisione cellulare. Le cellule eucariotiche hanno evoluto una rete complessa di proteine regolatrici note come "sistema di controllo del ciclo cellulare" che governa la corretta proliferazione cellulare. Il ciclo cellulare è dunque organizzato in fasi ed eventi molecolari cronologicamente determinati e regolati. Le fasi che lo caratterizzano sono quattro: fase G1, fase S, fase G2 e fase M.

L'insieme delle fasi G1, S e G2 è collettivamente identificato come **interfase**. Durante la fase S, affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, il genoma deve essere prima duplicato in modo semiconservativo; in seguito i cromosomi devono venire segregati nelle due cellule figlie durante la fase M. La fase M è a sua volta composta da due processi, strettamente collegati: **la mitosi**, durante la quale i cromosomi, ormai duplicati, della

cellula madre sono divisi tra le due cellule figlie e **la citodieresi**, che comporta la divisione del citoplasma della cellula progenitrice con la definitiva separazione delle cellule figlie. Il ciclo cellulare è un processo estremamente importante; errori durante questo processo potrebbero compromettere la vitalità cellulare. Per tale motivo, all'interno di esso, sono presenti dei punti di controllo o checkpoints, localizzati a livello delle transizioni G1/S e G2/M, che impediscono l'inizio della fase successiva se non è stata completata in modo corretto quella precedente. I periodi di tempo G1 fra la fine della mitosi (o lo stato G0) e l'inizio della fase S e G2 fra il termine della fase S e l'inizio della fase M sono denominati "gap" (G). In questi periodi di tempo si ha la maggior parte della sintesi proteica e dei cicli metabolici con conseguente aumento della massa cellulare, ed è qui che intervengono i principali meccanismi di regolazione. Le fasi G1 e G2 sono quelle che possono subire la maggior variabilità di durata e in alcuni casi particolari possono anche essere eliminate, contrariamente alle fasi S e M che sono essenziali e che rappresentano due eventi chiave del ciclo cellulare. Le cellule che hanno smesso di dividersi, in modo temporaneo o irreversibile (come le cellule nervose e quelle muscolari striate scheletriche), sono in uno stato di quiescenza definito fase G0, in cui la cellula esce dal suo ciclo cellulare [85].

Molti geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare sono stati individuati mediante studi eseguiti sul lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Questo è un microrganismo eucariotico unicellulare che si presta molto bene alle analisi genetiche e che possiede un'altissima omologia molecolare/genetica con gli eucarioti superiori, uomo compreso. Tali studi hanno permesso l'isolamento e la caratterizzazione di vari mutanti contenenti alterazioni delle diverse fasi del ciclo cellulare. I principali

mediatori biochimici che agiscono sulla regolazione del ciclo cellulare comprendono le cicline, le chinasi ciclina-dipendenti o CDK (cyclin dependent kinases), gli attivatori nucleari CAK (CDK-activating kinase), gli inibitori delle CDK (CKI).

Le CKI inibiscono l'attività delle CDK determinando l'arresto del ciclo cellulare, essi agiscono in una rete complessa regolando finemente ogni reazione biochimica e ogni processo della divisione cellulare. Numerosi lavori dimostrano che se i meccanismi di regolazione vengono meno, possono determinare una mancata regolazione del ciclo cellulare causando un evento principale della progressione neoplastica: crescita incontrollata [86].

Nelle cellule eucariotiche le **chinasi ciclina-dipendenti o CDK** regolano la progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare. L'attività di questa famiglia di protein chinasi dipende dalla loro associazione con delle subunità proteiche regolatrici dette **cicline**. Queste ultime sono proteine instabili, sintetizzate e degradate periodicamente, che si accumulano in specifiche fasi del ciclo e che non solo attivano le CDK, ma ne determinano anche la specificità di substrato. Sino a oggi sono state identificate otto diverse cicline, chiamate con una lettera dalla A alla I.

In ogni periodo del ciclo cellulare è presente un solo tipo di complesso CDK-ciclina cataliticamente attivo e, a seconda del complesso formatosi, vengono fosforilate molecole bersaglio differenti.

Nello specifico, la ciclina D ed E vengono espresse durante le fasi G₀/G₁ e sono anche identificate come cicline Start. La **ciclina D** legata alle CDK4 e 6, durante la fase G₁, una volta attivata dal segnale di un fattore di crescita via Ras, va a fosforilare, nel nucleo, la Rb, che prima inibiva il fattore di trascrizione E2F. Quest'ultimo, liberato dagli effetti inibitori della proteina Rb, può quindi avviare la trascrizione di geni che

mettono capo alla sintesi di altre proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, tra cui la ciclina E; anch'essa, attraverso il legame con CDK2, parteciperà alla fosforilazione di Rb [87,88]. La **ciclina A** viene sintetizzata durante la fase S e degradata durante l'anafase. Quest'ultima unita al CDK2 determina la progressione della fase S e la produzione della ciclina B. La **ciclina B** è altresì nota come "ciclina mitotica". La sua concentrazione e l'attivazione del complesso CDK1-ciclina B cresceranno fortemente a partire dalla fine della fase S per tutto G₂ fino all'inizio della mitosi (fase M), quando calerà drasticamente a causa della degradazione. Il complesso di CDK e Ciclina B è chiamato *Mitosis promoting factor* (MPF) ovvero fattore che promuove la mitosi. Tutte le cicline sono degradate dai proteosomi grazie al processo di ubiquitinazione [89].

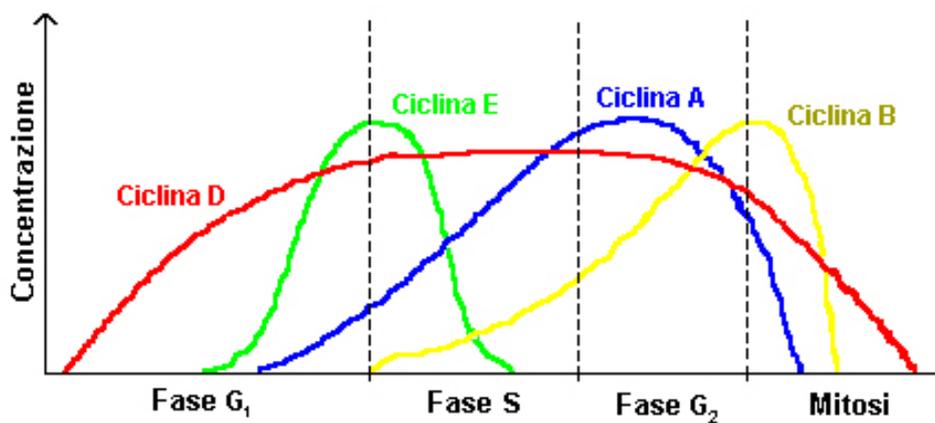


Fig 6: Espressione delle varie cicline durante le fasi del ciclo cellulare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti e anticorpi

Il terreno utilizzato per le colture linfocitarie è RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Germany) addizionato con L-glutamina 2 mM, aminoacidi non essenziali all'1%, acido piruvico all'1%, 2-mercaptoetanololo 2×10^{-5} mol/L (tutti da Invitrogen). Il siero bovino fetale (FCS), (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) è stato scomplementato a 56°C per 30 minuti e utilizzato al 10% nel terreno completo. Il tampone PBS (Phosphate Buffer Saline), privo di Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7.2, è stato acquistato presso la stessa ditta. La BSA (Bovine Serum Albumine), la sodiazide NaN_3 e la Poly-L-Lysine Solution sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La IL-2 ricombinante umana è stata fornita dalla ditta Eurocetus (Milano, Italia). La fitoemagglutinina è stata utilizzata (1:1000) Bio-Chrome. PMA (Forbolo Miristato Acetato), ionomicina e formaldeide sono state acquistate da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. La stratificazione su gradiente di densità delle cellule mononucleate è stata realizzata utilizzando Ficoll Lymphoprep™ (densità 1,077 g/l) (Oslo, Norway). Gli anticorpi monoclonali (mAb) anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD28 -CD161, -CCR6, -ciclina A, -ciclina B, -ciclina D, -IL17, -IL4, -IFN γ coniugati a fluorocromi quali (FITC), ficoeritrina (PE), Pacific Blue (PB), allofococianina (APC), PE Cy 7, APC Cy7, sono stati forniti da Becton Dickinson (Mountain View, CA), ad eccezione dell'anticorpo anti-IL-17, che è stato acquistato presso eBioscience (San Diego, CA). Il propidio ioduro (PI) è stato fornito da Invitrogen (Eugene, Oregon, USA). L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata mediante citofluorimetro BDLSRII (Becton Dickinson) usando il software FacsDIVA.

Il kit per la purificazione delle cellule CD4 e gli anticorpi coniugati a microbiglia anti-

fluorocromo sono stati acquistati presso Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Per la stimolazione delle cellule T sono stati usati anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 della ditta BD (Becton Dickinson). L' anticorpi anti-Tob1 , è stato fornito dalla ditta Abcam (Cambridge,UK). Le immunoglobuline di coniglio Rabbit IgG utilizzate per la saturazione sono forniti da Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Il colorante nucleare ToPro3 è stato acquistato da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). Il montante Vectashield mounting medium è fornito da Vector Laboratories (Burlingame, CA) ed il microscopio confocale utilizzato è lo Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena,Germany).

La timidina triziata, 3H-TdR, è stata acquistata presso Amersham (Little Chalfont, UK).

2.2 Reperimento del materiale biologico

I campioni di sangue periferico (PB), sono stati ottenuti da donatori adulti sani e volontari. Le procedure seguite nel presente studio sono conformi agli standard etici del Comitato Regionale per la Sperimentazione Umana.

2.3 Separazione su gradiente di densità di cellule MNC

Le sospensioni di cellule mononucleate (MNC) derivate da sangue periferico (PB) sono state ottenute mediante stratificazione su gradiente di densità utilizzando Ficoll-Hypaque (densità = 1,007 g/l), usando un rapporto di circa 3:2, centrifugando a 2300 giri/min (rpm) per 20 minuti a 4 °C. Dopo aver recuperato le cellule situate all'interfaccia plasma/Ficoll (anello di cellule mononucleate), queste sono state lavate per due volte (1100 rpm per 10 minuti) con soluzione fisiologica in modo da eliminare il Ficoll residuo. Le cellule sono state risospese in un volume noto di

soluzione fisiologica e contate.

2.4 Purificazione ed espansione di cellule T

La purificazione dei linfociti T CD4⁺ è avvenuta utilizzando il CD4 isolation kit II (Milteny Biotech, Bisley, Germany) mediante selezione negativa con colonna magnetica CS ed apparato Vario MACS. Utilizzando lo stesso metodo di separazione le cellule T CD4⁺ provenienti da sangue periferico di donatori sani sono state ulteriormente suddivise nelle due frazioni CD161-positiva (CD161⁺) e CD161-negativa (CD161⁻). In un esperimento aggiuntivo le cellule T CD4⁺CD161⁺ e CD4⁺CD161⁻ di sangue periferico sono state ulteriormente sottoposte a purificazione mediante sorting citofluorimetrico nella frazione CCR6⁺ e CCR6⁻ e successivamente coltivate in diluizione limite, in presenza di 10⁵ di PBMNCs irradiate (9000rad) utilizzate come "feeder", 1% di fitoemoagglutinina e IL-2 (50 U/ml) in terreno completo allo scopo di ottenere cloni cellulari Th17 e Th1, rispettivamente. Quindi i cloni ottenuti sono stati classificati, secondo i criteri suggeriti dalla letteratura scientifica, in base alla loro capacità di produrre, rispettivamente, IFN- γ , IL-4, o IL-17, in seguito a stimolazione policlonale con PMA e ionomicina. I cloni sono stati mantenuti in coltura in terreno completo contenente siero bovino fetale al 10% ad una concentrazione di circa 10⁶-10,5⁶ cell/pozzo in piastre multiwell da 24 pozzetti, in presenza di IL-2 ad una concentrazione di 50U/ml.

2.5 Sorting citofluorimetrico di cellule producenti citochine

Le cellule CD4⁺CD161⁺ e CD4⁺CD161⁻ derivate dal PB donatori sani sono state stimulate policlionalmente con PMA (molecola liposolubile in grado di attivare la

protein-chinasi C) (10ng/ml) e ionomicina (ionoforo del calcio) (1 µg/ml), recuperate dopo 3 ore e 30 minuti, lavate e incubate con anticorpi ingegnerizzati (catch reagent) anti-IFN-γ e anti-IL-17 (Milteny Biotec, Begisch Gladbach) per 5 minuti in ghiaccio. Il catch reagent è costituito da due anticorpi legati per la coda, dei quali uno è diretto verso il CD45 (marker espresso su tutti i linfociti in grande quantità), e l'altro verso la citochina d'interesse. Le cellule sono state poi risospese in terreno mantenuto ad una temperatura di 37°C, ed incubate per 45 minuti a 37°C in un'atmosfera di 5% CO₂, in continua rotazione mediante l'uso del dispositivo MACSmix (Milteny Biotec, Begisch Gladbach). A termine dell'incubazione le cellule sono state lavate in buffer freddo, marcate con anticorpi anti-CD3-Pacific Blue, CD161-PE, IL-17-APC and IFN-γ-FITC e separate al FACS Aria. Lo strumento è stato settato in modo da selezionare e raccogliere due popolazioni cellulari:

- CD3+ CD161+IL-17+IFN-γ- (Th17)
- CD3+ CD161+IL-17-IFN-γ+ (Th1)

2.6 Citofluorimetria

2.6.1 Analisi citofluorimetrica dei marcatori di superficie

Sulle varie sottopopolazioni linfocitarie ottenute dal PB di donatori sani, è stata valutata l'espressione di membrana delle molecole CXCR3, CCR6, CD3, CD4, CD8, CD161. Per ogni campione circa 3X10⁵ cellule sono state lavate in PBS pH 7.2 contenente BSA 0.5% e NaN₃ 0.02%. e, dopo l'aggiunta di 5 µl di gamma-globuline di coniglio (10 mg/ml) per saturare i recettori per il frammento costante delle immunoglobuline, sono stati aggiunti i vari anticorpi monoclonali specifici, coniugati a

fluorocromi. In seguito le cellule sono state incubate per circa 15 minuti in ghiaccio e lavate con PBS pH 7.2 contenente BSA 0.5% e NaN_3 0.02%. Successivamente, le cellule sono state sospese nel tampone di lavaggio e analizzate al citofluorimetro BDLSRII (Becton Dickinson) usando il software FacsDIVA.

2.6.2 Analisi citofluorimetrica della produzione di citochine su singola cellula

Le MNC, ottenute purificando il PB di donatori sani, sono state studiate analizzando le citochine presenti a livello intracellulare dopo stimolazione policlonale con PMA (estere del forbolo liposolubile in grado di attivare la protein-chinasi C, enzima citoplasmatico coinvolto nell'attivazione di vari fattori di trascrizione nucleari) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e con ionomicina (ionoforo del calcio) 1 μM . Due ore dopo lo stimolo è stata aggiunta brefeldina A, inibitore della secrezione proteica, alla concentrazione di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per impedire il rilascio di citochine da parte della cellula attivata per altre tre ore di incubazione. Le cellule sono state successivamente lavate con PBS pH 7.2, fissate in formaldeide al 2% e incubate a temperatura ambiente per 15 minuti. Quindi le stesse cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi rivolti verso molecole di superficie (anti-CD8, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD161) e contro citochine (anti-IL-17, anti-IFN- γ); il buffer di marcatura contiene saponina 0,5% con la funzione di permeabilizzare la membrana cellulare consentendo l'ingresso agli anticorpi. Dopo un'incubazione di 15 minuti, le cellule sono state lavate con PBS pH 7,2 contenente BSA 0,5% e saponina 0,5% e successivamente risospese nel buffer per essere analizzate al citofluorimetro.

2.6.3 Analisi citofluorimetrica dei livelli delle cicline

I cloni cellulari Th1 e Th17 sono stati stimolati con mAb anti-CD3 e anti-CD28 (usati entrambi 5µg/ml), a tempi di incubazione diversi (24,48 e 72 ore). Al termine di ogni tempo le cellule sono state raccolte e successivamente fissate in formaldeide al 2% per 15 minuti. Le stesse cellule sono state poi lavate e marcate con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi rivolti verso la ciclina A, la ciclina B e la ciclina D o l'isotipo di controllo per 15 minuti; il buffer di marcatura contiene saponina 0,5% con la funzione di permeabilizzare la membrana cellulare consentendo l'ingresso agli anticorpi. In seguito le cellule sono state analizzate al citofluorimetro BDLSRII (BD Biosciences).

2.7 Immunofluorescenza e microscopia confocale

L'analisi dei campioni al microscopio confocale ha previsto il preventivo trattamento dei vetrini su cui sono state fatte aderire le cellule con polilisina. La procedura richiede l'immersione dei vetrini prima in sapone, poi il risciacquo sotto acqua corrente ed immersione in acqua per soluzioni iniettabili. In seguito sono stati immersi prima in metanolo e poi in acetone e fatti asciugare a temperatura ambiente. La polilisina madre (1mg/ml) è stata diluita 1:100 in acqua per soluzioni iniettabili e portata ad una concentrazione finale di 10 µg/ml. Una volta preparata ne sono stati somministrati 500µl sopra ogni vetrino. I vetrini così trattati sono stati lasciati un'ora sotto cappa in presenza di raggi UV per consentire alla polilisina di asciugare. Una volta pronti sono stati utilizzati o conservati a 4°.

Le cellule da marcare sono state piastrate in numero di 200-300.000 cell/vetrino in un volume di 300-500 µl massimo e lasciate ad aderire per 40' in incubatore a 37°. In

seguito i vetrini sono stati lavati 5' in PBS pre-riscaldato a 37° e mantenuti a temperatura ambiente per evitare il distacco del campione dal vetrino stesso. Il fixing per la marcatura intracitoplasmatica è stato effettuato in formaldeide al 4% e incubato 40' a temperatura ambiente; i vetrini sono poi stati lavati 5' in BSA, 5' in PBS e poi immersi per 10 minuti in 0.1% triton per la permeabilizzazione. La saturazione di eventuali siti aspecifici è stata effettuata mediante incubazione per 20' con immunoglobuline di capra diluite 1:20 in BSA. In seguito le cellule sono state incubate per 40 minuti con l'anticorpo primario pAb Goat anti-Tob1 o con l'isotipo di controllo anti-mouseIgG1 entrambi portati alla concentrazione di 5ug/ml in BSA. Le cellule sono state, infine, lavate 5' in BSA ed incubati 30' con l'anticorpo secondario coniugato a fluorocromo in 488nm (1:1000), in tampone contenente anche il colorante TO-PRO-3 (0,2 mM). Il TO-PRO3 633 è una cianina monomerica in grado di intercalare la doppia elica del DNA nella regione AT, è eccitato a 633 nm (picco a 642nm) ed emette a 665nm: si utilizza quindi un laser rosso a diodo e ciò consente di evitare la compensazione elettronica che comporterebbe l'uso di intercalanti del DNA con spettri di emissioni sovrapponibili a quelli delle fluorescenze PE e FITC. Dopo 5' di lavaggio in PBS ai vetrini è stata aggiunta una goccia di montante oleoso per fluorescenza per evitare il fenomeno del photobleaching (Vectashield mounting medium) e sono stati coperti con vetrino coprioggetto. I preparati così ottenuti sono stati osservati con microscopio confocale Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany), dotato di obiettivo con ingrandimento 40X/0.75 ad immersione in olio. L'acquisizione di immagini è stata realizzata mediante il programma LSM 510 Software utilizzando luci laser con lunghezze d'onda di 488nm e 633nm.

2.8 Test di proliferazione

Per il test di proliferazione sono stati stimolati 1×10^5 cellule T con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, entrambi alla concentrazione di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, in assenza o presenza di IL-2 ricombinante alla concentrazione di 50 IU/ml o di PMA (10ng/ml) e ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Al 3° giorno di coltura è stata aggiunta timidina triziata ($^3\text{H-TdR}$) alla dose di 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{pozzetto}$ e lasciata in coltura per 8 ore. Successivamente è stato valutato l'accumulo intracellulare del radionuclide mediante beta-counter (Betaplate 1205 Wallac).

2.9 Real Time PCR (RT-PCR)

L'RNA totale è stato estratto dalle frazioni cellulari sopra citate, usando il kit RNeasy (Quiagen, Hilden, Germany) e trattato con DNasi I (Quiagen) per eliminare possibili contaminazioni da DNA genomico. L'RNA totale di ogni campione è stato retrotrascritto in cDNA usando TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguendo il protocollo del fornitore. La resa dell'estrazione è stata valutata allo spettrofotometro (Nanodrop – Thermo Scientific, Wilmington, USA) che consente di valutare sia la quantità di RNA che la purezza, quest'ultima intesa come contenuto di proteine e DNA rimasti.

La RT-PCR è stata eseguita utilizzando ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Tutte le amplificazioni sono state eseguite su MicroAmp optical 96-well reaction plate con TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems) ed usando Assay on Demand (Applied Biosystems). Le sonde e i primers usati sono stati acquistati presso la ditta Applied Biosystems. La quantificazione è stata realizzata sulla base del numero di

cellule e i risultati sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di riferimento GAPDH.

2.10 Trasduzione del lentivirus contenente RORC2

Cloni (n=3) Th1 sono stati attivati in presenza di APCs, nel rapporto 1:2, irradiate (9000 rads), mAb anti-CD3 (1µg/ml) e IL-2 (50 IU/ml); dopo 16 ore sono stati aggiunti i lentivirus pCCL EF1α NGFR or pCCL EF1α NGFR hRORC2 (Crome et al. 2009) ad una molteplicità di infezione (MOI, rapporto tra Unità Trasducenti e numero assoluto di cellule trasdotte) pari a 10 e, utilizzando la metodica *spinoculation*, la coltura è stata centrifugata ad una velocità di 1200g e una temperatura di 26°C per 2 ore. Le cellule T trasdotte sono state mantenute in coltura con IL-2 (100 IU/ml), purificate dopo dieci giorni con metodica immunomagnetica utilizzando mAbs anti-NGFR coniugati a PE e microbiglie anti-PE (purezza superiore al 98%) e infine espanse con APCs irradiate, mAb anti-CD3 e IL-2 per altre due settimane. La proliferazione delle cellule trasdotte è stata determinata mediante conta cellulare escludendo le cellule morte grazie per positività al Trypan Blue.

2.11 Silenziamento genico transiente mediante siRNA

E' stata effettuata la nucleofezione su 10^7 cellule di 3 cloni Th17 con siRNA contro IL4I1 umano (ON-TARGET plus SMART pool, Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO) o Tob1 umano (siGENOME SMARTpool, Thermo Fisher Scientific), entrambi alla concentrazione di 3µM, tramite elettroporazione con Amaxa Nucleofector (program T-020; Amaxa Biosystems) utilizzando il kit Human T Cell Nucleofector® (Lonza Basel,

Switzerland). Come controlli negativi sono stati utilizzati i pool di siRNA non-targeting ON-TARGET plus (NT) o siGENOME (Thermo Fisher Scientific) per i silenziatori di IL411 e Tob1, rispettivamente. Le cellule sono state recuperate dopo 72, 96 e 120 ore dalla nucleofezione per la valutazione dell'mRNA in RT-PCR, agli stessi tempi è stato effettuato un test di proliferazione allo stimolo con mAbs anti-CD3/CD28 valutato dopo ulteriori 72 ore.

2.12 Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stata realizzata come descritto in precedenza (Nebbio et al. 2005) utilizzando un anticorpo anti-hRORC (Abcam, ab41941; Cambridge, UK) su cloni Th17 stimolati con mAbs anti-CD3/CD28 per 6 ore. La PCR Quantitativa, effettuata su abi 7500 thermal Cycler, è stata realizzata utilizzando differenti serie di primers scelti utilizzando il database TRED (Jiang et al. 2007), dopo un'analisi, mediante PCR in silico, delle sequenze, già descritte in letteratura, come possibili regioni di attacco di RORC sui promotori di CD28 e IL411 (Wiemann et al. 2005). Dopo l'amplificazione i dati sono stati analizzati secondo un calcolo standardizzato (metodo $\Delta\Delta Ct$) e controllati per confronto con un opportuno controllo negativo. Infine, i quantitativi di DNA, immunoprecipitato per RORC, ottenuti in PCR per i promotori di CD28 e IL411 sono stati messi in grafico come percentuale della cromatina totale.

2.13 Microarray

I profili di espressione genica su cloni Th1 e Th17 umani sono stati ottenuti mediante

la tecnica del microarray su cDNA utilizzando il kit One Colour Microarray Quick Labelling (Agilent Technologies, Cernusco s/N, MI, Italy), secondo il protocollo del fornitore.

2.14 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il T-test a due code per campioni appaiati o non appaiati. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per un p inferiore a 0.05.

3. RIASSUNTO E SCOPO DELLA TESI

Le risposte infiammatorie, altamente connesse al sistema immunitario, hanno un ruolo importante nella difesa dell'organismo contro agenti infettivi. L'infiammazione mediata dalla risposta immune può tuttavia in certe condizioni, essere responsabile del danno tissutale, come accade nelle malattie autoimmuni. Diverse popolazioni cellulari, dell'immunità innata e di quella acquisita, contribuiscono a innescare e a mantenere lo stato infiammatorio, direttamente e/o attraverso l'attivazione delle cellule tissutali. Storicamente, i linfociti T CD4⁺ umani sono stati classificati in due sottopopolazioni funzionali: le cellule Th1 e quelle Th2. Recentemente, però, sia in modelli murini che nell'uomo è stata descritta una terza sottopopolazione di cellule effettrici T CD4⁺, che, data la loro capacità di produrre l'interleuchina (IL)-17A, sono state denominate Th17. Negli ultimi anni il nostro gruppo di ricerca si è occupato della caratterizzazione fenotipica e funzionale proprio di questo nuovo subset di linfociti T umani, le cellule Th17, riportando dati assolutamente innovativi circa la loro origine e la loro implicazione nella patogenesi di disordini immuno- correlati quali il morbo di Crohn e l' Artrite Idiopatica Giovanile. Un importante aspetto emerso dai nostri studi, che tuttavia necessitava di ulteriori approfondimenti, consisteva nell'osservazione della bassa frequenza di cellule Th17, ritrovate nei tessuti e nel circolo, di soggetti affetti da malattie autoimmuni o infiammatorie croniche. Questa bassa frequenza è stata attribuita alla forte plasticità dei linfociti Th17 che è stata ampiamente descritta dalla letteratura scientifica degli ultimi anni [90]. In condizioni di flogosi è stata infatti evidenziata la loro polarizzazione verso il fenotipo Th1 non classico e ciò potrebbe dare spiegazione della rarità di queste cellule nei tessuti, sede di infiammazione, dei suddetti

pazienti. Durante il corso del mio dottorato, e all'interno dell'ampio progetto sul quale esso verte, mi sono quindi occupata di studiare e approfondire ulteriormente la proliferazione e l'espansione delle cellule Th17 come risposta funzionale alla stimolazione antigenica e i meccanismi molecolari che la caratterizzano. Una delle ipotesi che abbiamo formulato riguardo a questo fenomeno è stata la possibilità che le cellule Th17 presentassero un'alterata capacità di proliferare in risposta all'antigene. I risultati riportati nel presente lavoro di tesi dimostrano che le cellule Th17 umane, a causa di una loro ridotta espressione e fosforilazione della catena CD3 ζ , sono caratterizzate da un potenziale proliferativo e di produzione di IL-2 ridotto in risposta alla stimolazione con anti-CD3/CD28, se confrontate con le cellule Th1: è emerso, inoltre, che tale riduzione è conseguenza dell'aumento nell'espressione del gene di IL4I1 presenti in queste cellule. Da questo studio è inoltre emerso che l'elevata espressione di IL4I1 mantiene elevati i livelli di un'altra proteina anch'essa molto più espressa dai linfociti Th17 e anch'essa coinvolta nella regolazione dei meccanismi della proliferazione cellulare: la proteina Tob1. L'elevata espressione di entrambe queste molecole è risultata strettamente dipendente dall'espressione di RORC. Nel loro complesso questi dati suggeriscono un'ulteriore spiegazione della bassa frequenza di cellule Th17, osservata nell'uomo nei tessuti infiammati, la quale rappresenterebbe il risultato di un sistema di auto-regolazione della loro espansione dipendente dal loro specifico fattore di trascrizione RORC.

4. RISULTATI

4.1 Le cellule Th17 umane non proliferano e non producono IL-2 in risposta allo stimolo anti-CD3/CD28

La capacità delle cellule Th17 e Th1 di proliferare a seguito dello stimolo anti-CD3/CD28 o PMA/ionomicina è stata verificata utilizzando in prima analisi cloni derivati dalle popolazioni linfocitarie CD4+CD161+CCR6+ e CD4+CD161-CCR6- isolate da PB di donatori sani. La stimolazione in vitro con anti-CD3/CD28 induceva una spiccata proliferazione dei cloni Th1, mentre sui cloni Th17 non produceva alcun effetto significativo (fig. 1A) a differenza della stimolazione con PMA/ionomicina in presenza della quale i cloni Th17 mostravano una risposta proliferativa valutabile seppur inferiore rispetto ai cloni Th1 (fig. 1A). Sono stati quindi dosati i livelli di IL-2 dei supernatanti delle suddette colture: mentre i cloni Th1 producevano alti livelli di IL-2 sia in presenza di anti-CD3/CD28 che in presenza di PMA/ionomicina, i cloni Th17 producevano IL-2, peraltro a livelli significativamente più bassi rispetto ai Th1, solo nella condizione PMA/ionomicina (fig. 1B). La valutazione dei livelli di espressione di mRNA per la IL-2 su cloni Th17 e Th1 ha prodotto risultati analoghi (fig. 1C).

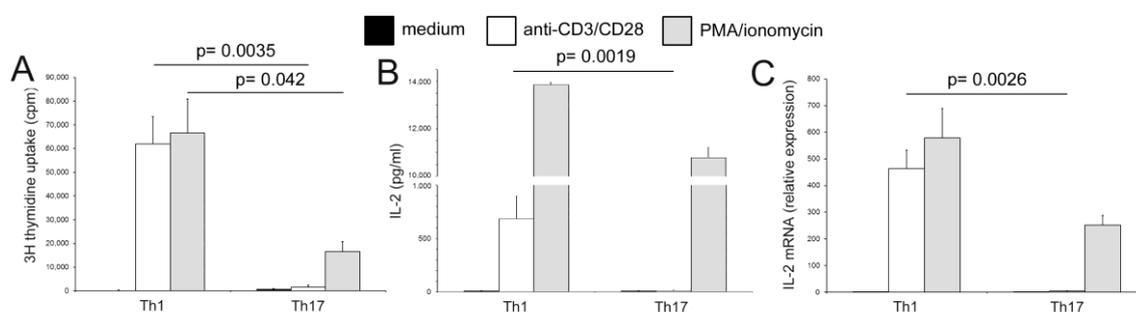


Figura 1. L'alterata proliferazione delle cellule Th17 in seguito alla stimolazione anti-

CD3/CD28 è dovuta alla loro incapacità di produrre e di rispondere a IL-2.

Cloni Th1 (n = 10) e Th17 (n = 10) sono stati stimolati con anti-CD3/CD28 o PMA/Ionomicina e poi valutate al quinto giorno per: **(A)** proliferazione mediante incorporazione di ³H-TdR; **(B)** produzione di IL-2 sui surnatanti **(C)** Cloni Th1 (n = 10) e Th17 (n = 10) sono stati stimolati con anti-CD3/CD28 (6 ore) o PMA/Ionomicina (3 ore) e poi valutati per l'espressione dell'mRNA per la IL-2 mediante RT-PCR quantitativa in tempo reale. I risultati sono stati normalizzati sulla base dell'espressione di mRNA per GAPDH.

4.2 Le cellule Th17 esprimono alti livelli di IL4I1

L'analisi in microarray del profilo di espressione genica di cloni Th1 confrontati con cloni Th17 ha mostrato che il trascritto di IL4I1 era significativamente aumentato nei cloni Th17 rispetto ai Th1. IL4I1 è un gene codificante per la forma secreta di una L-amminoacido-ossidasi che inibisce la proliferazione dei linfociti T, in vitro, inducendo una temporanea riduzione nell'espressione della catena CD3 ζ a causa della produzione enzimatica di H₂O₂ [91]. Come mostrato in fig.2A, i livelli di espressione dell'mRNA di IL4I1 su cloni Th1 attivati o meno sono pressoché nulli; al contrario, i cloni Th17 presentano livelli elevati del trascritto di IL4I1 già in assenza di attivazione con ulteriore incremento in seguito a stimolazione con anti-CD3/CD28 (fig. 2A). La stessa tendenza è stata osservata ex vivo, in cellule Th17 e Th1 derivate da PB (fig.2B). Infine il silenziamento transiente di IL4I1 in cloni Th17, ottenuto mediante specifici siRNA, produceva una riduzione del 50% dell'espressione di mRNA di IL4I1 e un aumento significativo della proliferazione, espressione di mRNA per la IL-2 e produzione di IL-2 nelle cellule Th17 stimulate a tempi diversi con anti-CD3/CD28.

(fig.2C).

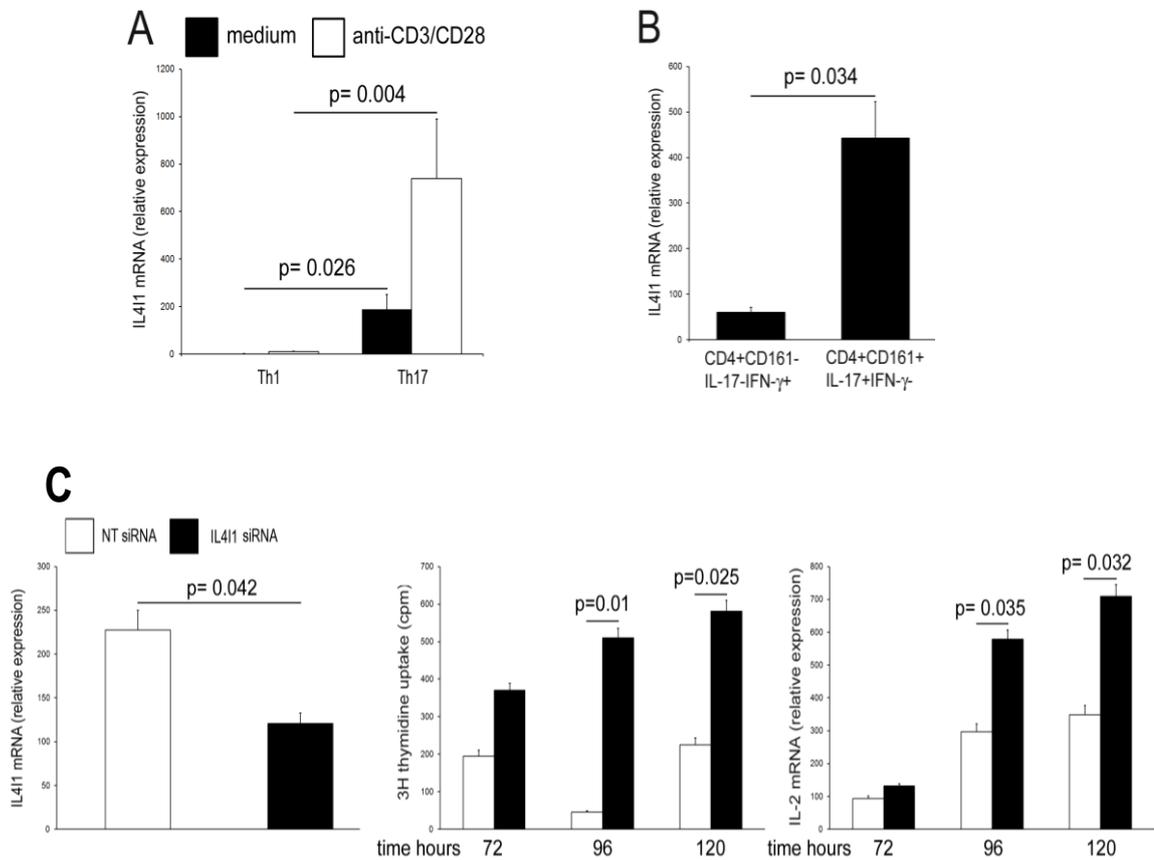


Figura 2. Aumentata espressione di IL4I1 nelle cellule Th17.

(A) L' espressione dell'mRNA per IL4I1, indotta dalla stimolazione anti-CD3/CD28 su cloni Th1 (n = 10) e Th17 (n = 10), è stata valutata RT-PCR quantitativa in tempo reale. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH.

(B) L'espressione dell'mRNA per IL4I1 sulle popolazioni Th1 (n = 3) e Th17 (n = 3) isolate ex vivo da PB è stata valutata in RT-PCR quantitativa in tempo reale. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH.

(C) L'espressione di mRNA per IL4I1 è stata valutata in RT-PCR quantitativa in tempo

reale in cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo, 96 ore dopo la nucleofezione. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH. La proliferazione indotta da anti-CD3/CD28 su cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo è stata valutata mediante l'incorporazione di ³H-TdR ai tempi indicati. I livelli di mRNA per IL-2 su cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo e stimolati con anti-CD3/CD28, sono stati valutati in RT-PCR quantitativa in tempo reale ai tempi indicati. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH. I risultati sono espressi come medie di 3 repliche (\pm SE).

4.3 L'incremento di IL4I1 nelle cellule Th17 è strettamente dipendente dal RORC

Ci siamo quindi chiesti se l'aumentata espressione di IL4I1, così come la ridotta capacità a proliferare e a produrre IL-2 in risposta ad anti-CD3/CD28 delle cellule Th17 fosse dipendente dalla loro espressione del fattore di trascrizione RORC. Cloni Th1 sono stati trasdotti con un lentivirus contenente RORC2 o un costrutto di controllo e sono stati successivamente valutati per l'espressione di mRNA per RORC, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL4I1 e IL-2 e per la loro capacità di proliferare in risposta alla stimolazione con anti-CD3/CD28. Come atteso tutti i cloni trasdotti con RORC2 esprimevano elevati livelli di mRNA per RORC, IL-17A e IL-17F rispetto alle cellule trasdotte con il vettore vuoto, mentre i livelli di mRNA per la IL-21 erano paragonabili nelle due popolazioni. (fig. 3A). Inoltre, i cloni trasdotti con RORC2 mostravano una maggior espressione di mRNA per IL4I1 sia in assenza che in presenza dello stimolo anti-CD3/CD28 rispetto

alla controparte contenente il vettore di controllo (fig.3A). Infine, dopo stimolazione con anti-CD3/CD28, le cellule trasdotte con RORC2 mostravano livelli di espressione di mRNA per la IL-2 significativamente ridotti (fig.3A) così come una diminuzione nella risposta proliferativa (fig.3B) quando paragonati al controllo negativo. Utilizzando l'approccio sperimentale opposto, ovvero silenziando RORC2, mediante opportuni siRNA, in cloni Th17, si osservava una marcata riduzione nei livelli di mRNA sia di RORC che di IL411 (fig.3C) insieme ad un incremento della proliferazione cellulare (fig.3D). Infine, la RT-PCR quantitativa real-time, condotta sul DNA di cloni Th17 immunoprecipitati con mAb anti-RORC, utilizzando primers specifici per il promotore del gene IL411, ha provato che esiste un'interazione diretta tra RORC e IL411 (fig.3E).

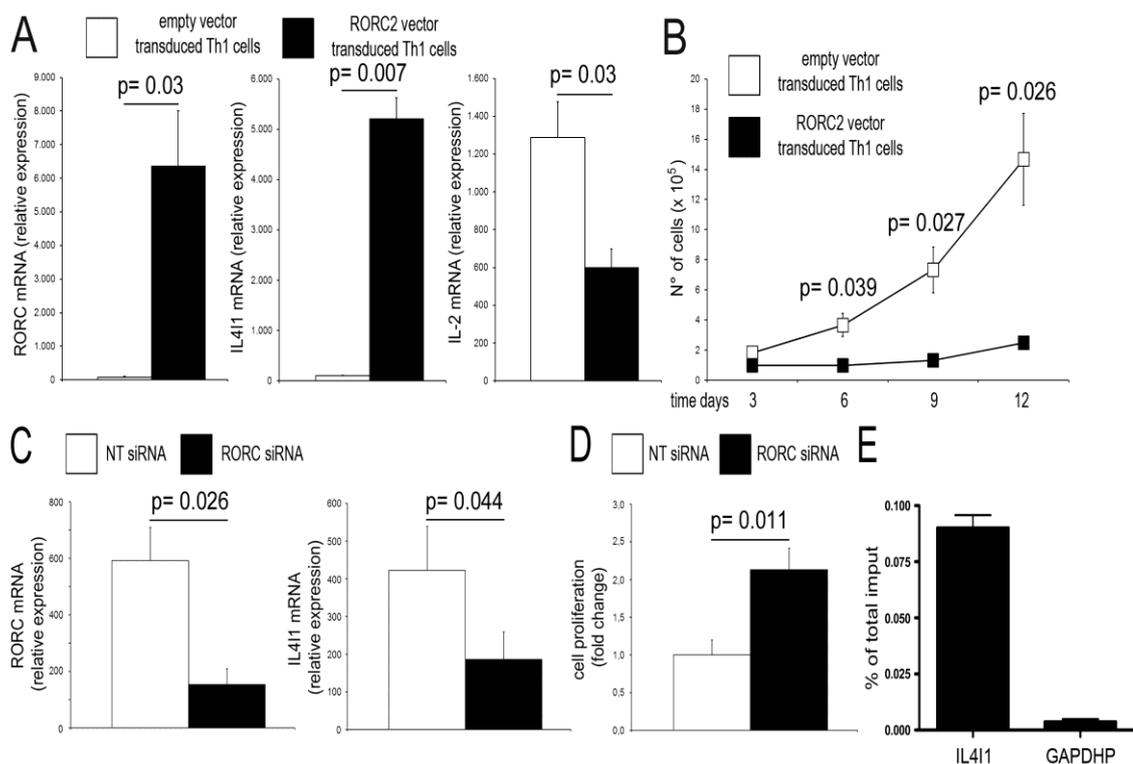


Figura 3. L'espressione di IL411 nelle cellule Th17 è dipendente dal RORC.

(A) L'espressione dell' mRNA per RORC, IL411 e IL-2 è stata valutata in RT-PCR

quantitativa in tempo reale in cloni Th1 (n = 3) trasdotti con RORC2 o col vettore

vuoto e stimolati anti-CD3/CD28. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH.

(B) Il numero di cellule vitali, è stato valutato in diversi momenti delle colture in vitro.

(C) L'espressione di mRNA per RORC e IL4I1 è stata valutata in RT-PCR quantitativa in tempo in cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per RORC o con controllo negativo, 96 ore dopo la nucleofezione. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH.

(D) La proliferazione di cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per RORC o con controllo negativo, indotta dalla stimolazione anti-CD3/CD28 per 4 giorni, è stata valutata mediante l'incorporazione di ³H-TdR. I risultati sono espressi come fold change dei cloni Th17 trasdotti con siRNA per RORC vs i trasdotti col controllo negativo.

(E) La tecnica di CHIP è stata effettuata utilizzando anticorpi anti-RORC umano su un pool di cloni Th17 stimolati con anti-CD3/CD28. Il DNA immunoprecipitato è stato amplificato in RT-PCR in tempo reale, utilizzando primer specifici per i promotori di IL4I1 e GAPDH, i risultati ottenuti con il metodo $\Delta\Delta C_t$ sono stati poi rappresentati come percentuale dell'input totale. Sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti. I risultati sono espressi come valori medi (\pm SE) del numero indicato di esperimenti.

4.4 Le cellule Th17 esprimono alti livelli della proteina Tob1

L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti in microarray, ha evidenziato un'altra proteina espressa a livelli significativamente più alti nei cloni linfocitari Th17 rispetto

ai cloni linfocitari Th1: la proteina Tob1, membro della famiglia delle proteine anti-proliferative TOB/BTG [91]. Nei linfociti T CD4+, Tob1 gioca un ruolo chiave per garantire la progressione del ciclo cellulare. Tale proteina viene, infatti, degradata rapidamente nelle fase G1 precoce. Alti livelli di tale proteina determinano un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. A tal proposito, ci siamo quindi chiesti se anche l'aumentata espressione di tale proteina potesse giocare un ruolo nella risposta proliferativa dei linfociti Th17.

Allo scopo di supportare i dati emersi dall'analisi bioinformatica abbiamo, dunque, valutato i livelli di mRNA di Tob1, con RT-PCR quantitativa, in cloni Th17 e cloni Th1 derivati da sangue periferico di donatori sani.

Come mostrato in fig. 4A, i livelli di Tob1 risultano significativamente aumentati nei cloni Th17 rispetto ai cloni Th1. Inoltre stimolando i cloni con anti-CD3 e anti-CD28 i livelli di Tob1 risultano significativamente diminuiti in entrambe le popolazioni cellulari ma si osserva anche che i cloni Th17 mantengono comunque livelli di mRNA più alti rispetto ai cloni Th1. Tale dato viene ulteriormente confermato dall'analisi mediante microscopio confocale nella quale si evidenzia un'aumentata espressione e localizzazione nucleare della proteina Tob1 nei cloni Th17 rispetto ai cloni Th1 (fig. 4B). Al fine di escludere che tali differenze potessero essere dovute ad un artefatto dato da cellule T coltivate in vitro a lungo termine, abbiamo valutato i livelli di mRNA di Tob1 nelle frazioni cellulari CD161+IL-17+IFN- γ - (Th17) e CD161-IL-17- IFN- γ + (Th1) ottenute mediante sorting citofluorimetrico dai linfociti T CD4+ del sangue periferico di donatori sani.

In accordo con i dati ottenuti precedentemente dall'analisi effettuata sui cloni, i linfociti Th17 derivati ex-vivo dal sangue periferico esprimono livelli

significativamente più elevati rispetto ai linfociti Th1 (fig. 4C).

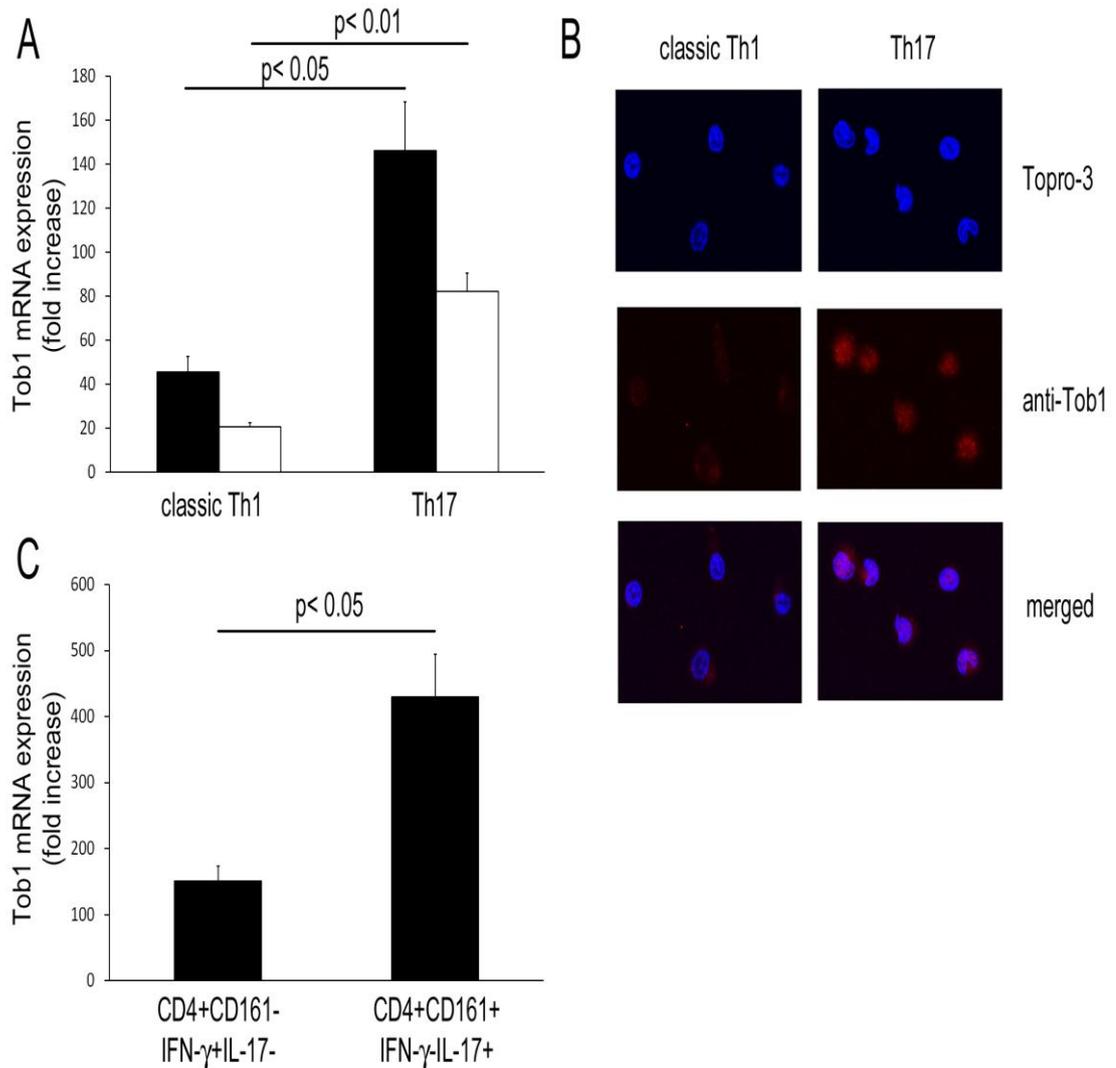


Figura 4. Aumentata espressione della proteina Tob1 nei linfociti Th17.

(A) I livelli di mRNA di Tob1 sono stati valutati in cloni Th1 (n=12) e cloni Th17 (n=12) in presenza di solo medium (colonna nera) o stimolati con mAb anti- CD3 e anti- CD28 (colonna bianca).

(B) Analisi in microscopio confocale rappresentativa dell'espressione della proteina Tob1 eseguita in tre cloni Th1 e Th17.

(C) Le popolazioni cellulari CD4+CD161-IFN- γ +IL17- e CD4+CD161-IFN- γ -IL17+ sono state ottenute con sorting citofluorimetrico dal sangue periferico di tre donatori sani, in seguito a stimolazione con PMA e ionomicina. Le colonne rappresentano i valori medi (\pm SE) dell'espressione dell'mRNA di Tob1.

4.5 Le cellule Th17 mostrano bassi livelli dei geni target e dei repressori della proteina Tob1

In studi recenti è stato dimostrato che la funzione della proteina Tob1 è quella di ridurre o promuovere la sintesi di regolatori positivi (come le cicline e cdk2) o negativi (p27kip1) del ciclo cellulare [92]. A tal proposito abbiamo valutato i livelli di m-RNA della ciclina A, della ciclina B, della ciclina D, della ciclina E, cdk e p27kip1 in cloni Th17 e cloni Th1 stimolati o non con anti-CD3 e anti-CD28. Come mostrato in figura 5A i livelli di ciclina A, di ciclina B, ciclina D, ciclina E e cdk risultano significativamente diminuiti nei cloni Th17 rispetto ai cloni Th1, mentre i livelli di m-RNA di p27kip1 risultano significativamente aumentati nei cloni Th17 rispetto ai Th1.

Inoltre, stimolando cloni Th1 con anti-CD3 e anti-CD28 e valutando a tempi diversi l'espressione delle cicline A, B, D abbiamo osservato che i livelli di m-RNA di queste tre cicline rimangono significativamente aumentati nei cloni Th1 a differenza dei cloni Th17 dove non si osserva nessuna variazione significativa (fig 5B).

Tali dati, dunque, dimostrano chiaramente che alti livelli di m-RNA della proteina Tob1 nei linfociti Th17 sono associati ad un effetto inibitorio per la progressione del ciclo cellulare. Studi recenti hanno evidenziato che la proteina Tob1 ha un rapido turnover mediato dal sistema ubiquitina-proteasoma. Un recente studio ha dimostrato che Skp2, proteina F-box implicata nella regolazione della progressione

del ciclo cellulare, promuove l'ubiquitinazione e la successiva degradazione di vari regolatori negativi del ciclo cellulare tra cui p27 ma in particolare della proteina Tob1 [93]. Al fine di stabilire se i livelli elevati di m-RNA della proteina Tob1, trovati nei linfociti Th17, fossero associati ad una bassa espressione della proteina Skp2, abbiamo valutato i livelli di m-RNA di tale proteina in cloni Th17 e cloni Th1 stimolati o non con anti-CD3 e anti-CD28. Come mostrato in figura 5C, i livelli della proteina Skp2 risultano significativamente diminuiti nei cloni Th17 rispetto ai cloni Th1, confermando ulteriormente la ridotta capacità proliferativa di tali cellule.

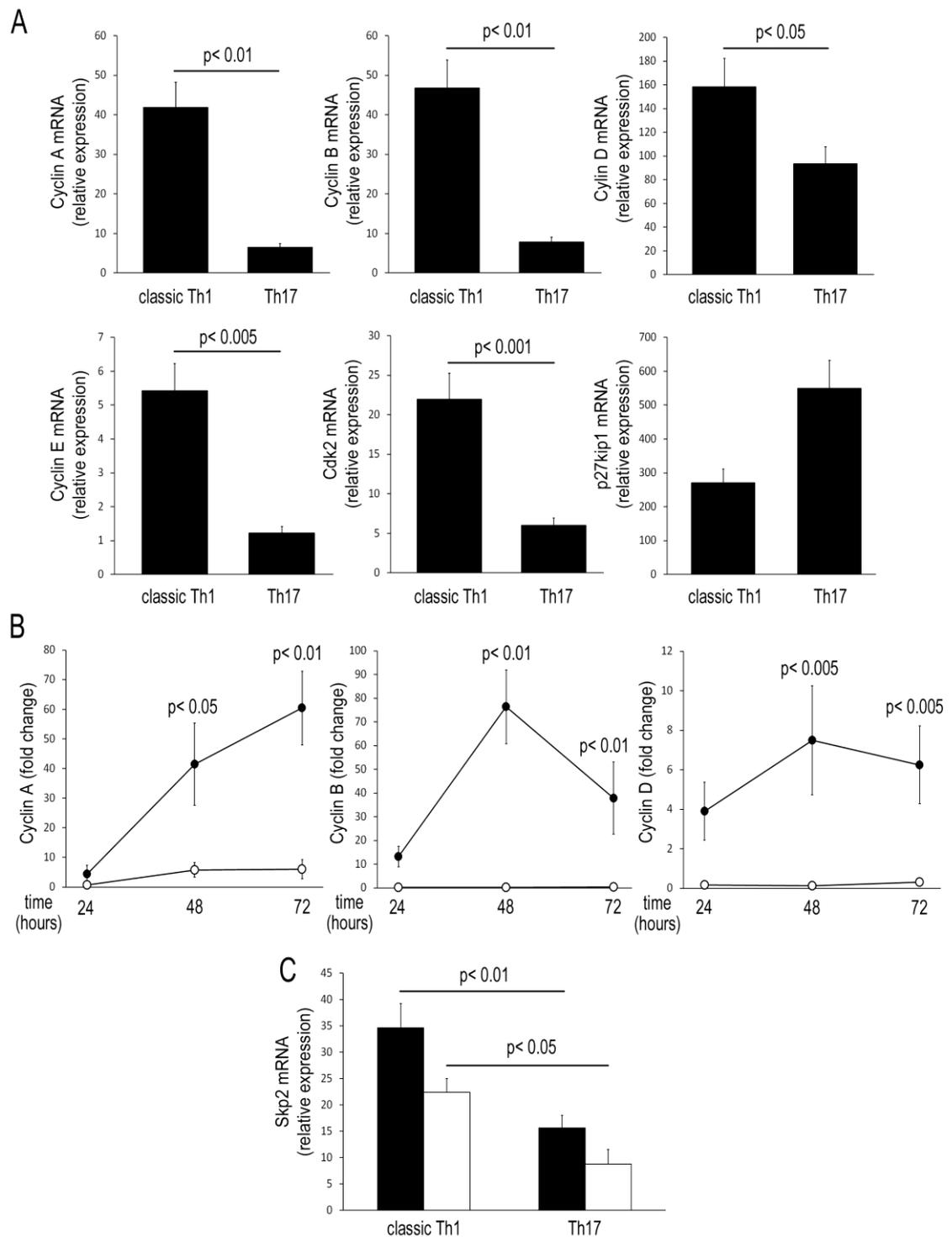


Figura 5. Alti livelli dell'espressione della proteina Tob1, nei linfociti Th17, determinano un'inibizione del ciclo cellulare dopo stimolazione con mAb anti- CD3 e anti- CD28.

(A) I livelli di mRNA della ciclina A, ciclina B, ciclina D, ciclina E, Cdk2 e p27kip1 sono stati valutati in cloni Th1 (n=12) e cloni Th17 (n=12) in presenza di solo medium

(dato non mostrato) o stimolati con mAb anti- CD3 e anti- CD28 (colonne nere).

(B) L'espressione delle cicline A, B e D sono state valutate in cloni Th1 (simbolo nero n=4) e cloni Th17 (simbolo bianco n=4) dopo 24,48,72h di stimolazione con anti-CD3 e anti-CD28 mediante citofluorimetro.

(C) I livelli di mRNA della proteina Skp2 sono stati valutati in cloni Th1 (n=12) e cloni Th17 (n=12) in presenza di solo medium (colonne nere) o stimolati con mAb anti-CD3 e anti- CD28 (colonne bianche).

4.6 I livelli elevati della proteina Tob1 dipendono da IL4I1.

Sulla base dei risultati descritti precedentemente ci siamo chiesti se anche l'aumentata espressione della proteina Tob1 nelle cellule Th17 dipendesse dalla loro espressione del fattore di trascrizione RORC.

A tal proposito, abbiamo valutato l'espressione dell'mRNA di queste due molecole, e come mostrato in figura 6A esiste una forte correlazione tra esse. Questa osservazione ci ha spinto ad indagare se il fattore RORC fosse direttamente coinvolto nella regolazione dell'espressione della proteina Tob1. Abbiamo, dunque, valutato la RT-PCR quantitativa real-time, condotta sul DNA di cloni Th17 immunoprecipitati con mAb anti-RORC, utilizzando primers specifici per il promotore del gene Tob1 e da questo esperimento si evince che non esiste nessuna interazione diretta tra RORC e la proteina Tob1. Per confermare ulteriormente tale risultato abbiamo utilizzato l'approccio sperimentale opposto, ovvero abbiamo silenziando RORC2, mediante opportuni siRNA, in cloni Th17. Come atteso, si osserva una marcata riduzione nei livelli di mRNA di RORC mentre i livelli di Tob rimangono invariati (dato non mostrato) confermando così che RORC non è direttamente coinvolto nella regolazione

dell'espressione di questa proteina.

Ci siamo quindi chiesti se l'aumentata espressione di IL4I1 che, nei cloni Th17, causava una ridotta capacità proliferativa e una ridotta capacità di produrre IL-2 in risposta ad anti-CD3/CD28, potesse regolare l'espressione della proteina Tob1. A tal proposito abbiamo valutato i livelli di espressione dell'mRNA di IL4I1 e della proteina Tob1 in cloni Th17 osservando una significativa correlazione tra esse (fig. 6B). Al fine di chiarire ulteriormente il nostro dubbio abbiamo silenziando IL4I1, mediante opportuni siRNA, in cloni Th17. Come atteso si osserva una marcata riduzione nei livelli di mRNA sia di IL4I1 che di Tob1 insieme ad un incremento dell'espressione dell'mRNA della IL2 (fig.6C), mentre i livelli di espressione di Skp2 non sono influenzati (dato non mostrato). Questo dato ci ha permesso di affermare che la proteina Tob1 viene regolata da IL4I1.

Infine, per supportare ulteriormente i nostri risultati, abbiamo effettuato il silenziamento transiente di Tob1 in cloni Th17, ottenuto mediante specifici siRNA, e abbiamo osservato che si produceva una riduzione del 50% dell'espressione di mRNA di Tob1, un aumento significativo dell'espressione di mRNA per la IL-2 e un ripristino della proliferazione cellulare (fig.6D).

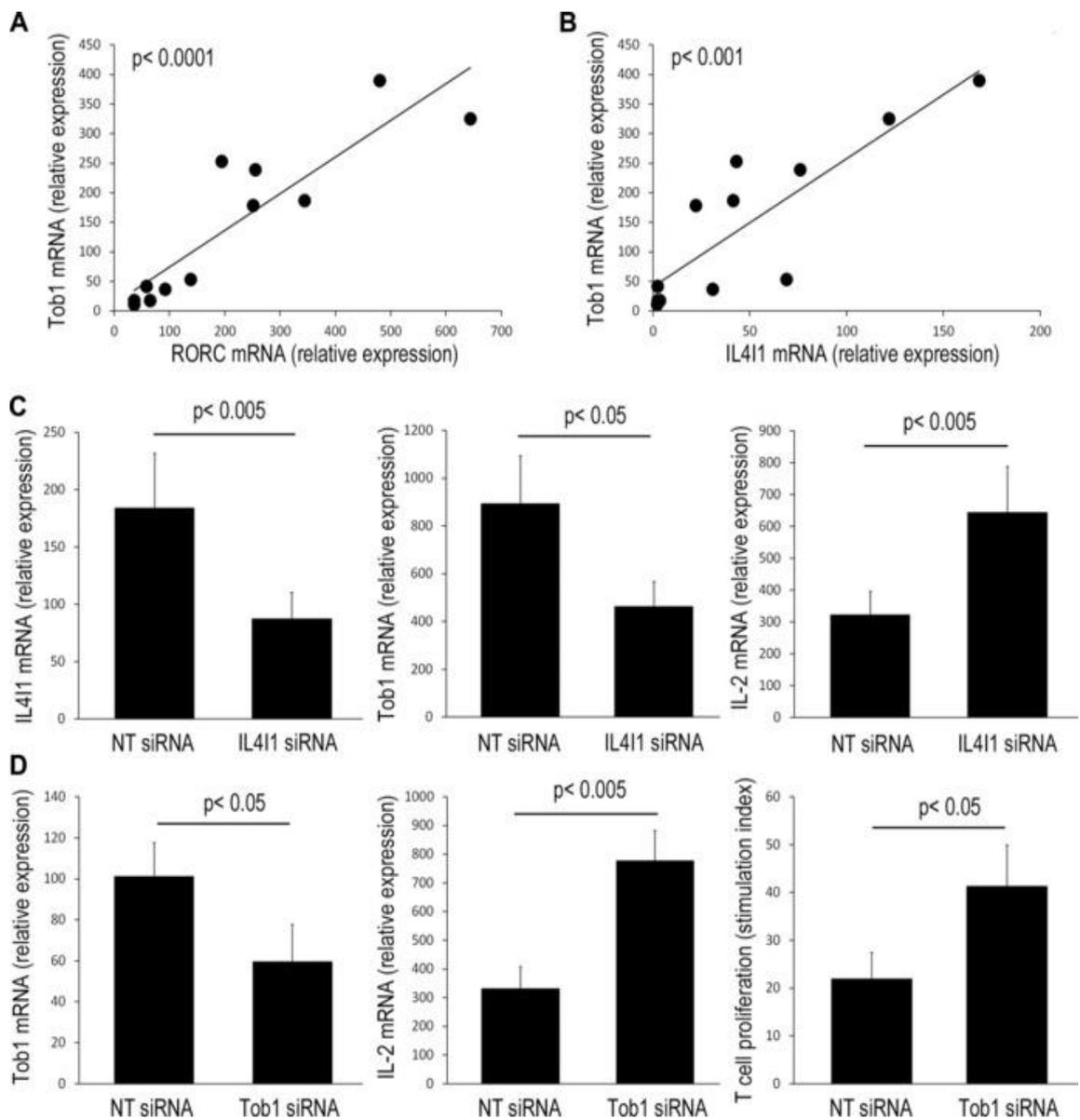


Figura 6. Nei linfociti Th17 l'espressione della proteina Tob1 correla con l'espressione di RORC e IL4I1, ma è dipendente da IL4I1.

(A) Correlazione tra i livelli di espressione di RORC e Tob1 in cloni Th17 (n=12).

(B) Correlazione tra i livelli di espressione di IL4I1 e Tob1 in cloni Th17 (n=12).

(C) L'espressione di mRNA per IL4I1 e di Tob1 è stata valutata in RT-PCR quantitativa in tempo reale in cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo, 96 ore dopo la nucleofezione. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH. I livelli di mRNA per IL-2 su cloni Th17 (n = 3)

trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo e stimolati con anti-CD3/CD28, sono stati valutati in RT-PCR quantitativa in tempo reale ai tempi indicati. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH. I risultati sono espressi come medie di 3 repliche (\pm SE).

(D) L'espressione di mRNA per Tob1 e di IL2 è stata valutata in RT-PCR quantitativa in tempo reale in cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per IL4I1 o con controllo negativo, 96 ore dopo la nucleofezione. I risultati sono stati normalizzati sull'espressione di mRNA per GAPDH. La proliferazione di cloni Th17 (n = 3) trattati con siRNA per Tob1 o con controllo negativo, indotta dalla stimolazione anti-CD3/CD28 per 4 giorni, è stata valutata mediante l'incorporazione di ^3H -TdR. I risultati sono espressi come medie di 3 repliche (\pm SE).

5. DISCUSSIONE

Gli ultimi studi in campo immunologico hanno sempre più sottolineato l'importanza del ruolo dei linfociti Th17 nella patogenesi di malattie autoimmuni ed infiammatorie croniche oltre che nella fisiologica risposta a funghi e batteri extracellulari [94,95]. Il complesso programma funzionale di questa sottopopolazione linfocitaria è tuttora oggetto di studio. In questo lavoro di tesi abbiamo voluto verificare l'ipotesi secondo cui il basso numero di cellule Th17, presenti nei tessuti infiammati di soggetti affetti da patologie mediate da questa popolazione linfocitaria, fosse attribuibile alla loro ridotta capacità di proliferare ed espandersi in risposta alla stimolazione antigenica. In primo luogo, abbiamo dimostrato che le cellule Th1 sono caratterizzate da una spiccata proliferazione e produzione di IL-2 a seguito della stimolazione anti-CD3/CD28 mentre le cellule Th17 non presentano lo stesso tipo di risposta. Inoltre, i cloni Th17 sono risultati incapaci di rispondere alla citochina IL-2 stessa, a livelli paragonabili a quelli osservati sui cloni Th1, e, infatti, quando messi in coltura in presenza di anti-CD3/CD28 ed IL-2 si osservava una ripresa solo parziale della loro proliferazione. Queste anomalie sono state riscontrate anche in esperimenti condotti ex-vivo su cellule Th17 circolanti, a conferma del fatto che non ci trovavamo di fronte ad un artefatto riconducibile all'uso di cellule Th17 coltivate a lungo termine. Nel loro complesso, questi dati provano chiaramente che le cellule Th17, a differenza delle Th1, sono caratterizzate da una scarsa, pressoché assente, proliferazione per almeno due ragioni: (i) un deficit nella produzione di IL-2 in risposta ad una segnalazione sul TCR; (ii) una ridotta capacità di queste cellule di entrare nel ciclo cellulare. Per approfondire il significato di questi risultati, ci siamo avvalsi dei dati ottenuti dall'analisi in microarray e abbiamo confrontato l'espressione di geni

presumibilmente coinvolti nel controllo delle prime fasi della cascata segnalatoria del CD3 nei cloni Th17 rispetto ai Th1. Uno dei possibili candidati è stato IL4I1 che risultava significativamente più espresso sui cloni Th17. IL4I1, descritto per la prima volta nelle cellule B [96], è stato valutato anche nelle DC murine e umane, dove codifica per una L-fenilalanina ossidasi che è associata ad una diminuzione transiente della catena CD3 ζ , e all'inibizione della proliferazione dei linfociti T conseguenti alla produzione enzimatica di H₂O₂ [91]. I dati riportati in questo lavoro, mostrano che IL4I1 è altamente espresso in cellule Th17 non stimolate e che viene ulteriormente aumentato dalla loro attivazione, per contro nelle cellule Th1 la sua espressione risulta pressoché inalterabile siano esse stimolate o meno. In accordo con quanto detto, il silenziamento di IL4I1 sulle cellule Th17 ha infatti incrementato la loro risposta proliferativa e la loro capacità di produrre IL-2. Abbiamo inoltre dimostrato che l'espressione di IL4I1 nelle cellule Th17 è strettamente dipendente da RORC: infatti, la trasduzione di RORC in cellule Th1 non solo era capace di indurre l'espressione di IL-17A, IL-17F e IL4I1 ma rendeva anche queste cellule incapaci di proliferare e di produrre IL-2 in risposta alla simulazione dello stimolo antigenico. Da un altro punto di vista, il silenziamento di RORC in cloni Th17, ha ridotto notevolmente l'espressione di IL4I1, supportando ulteriormente l'ipotesi di una stretta correlazione tra la presenza di RORC e l'incapacità delle cellule Th17 di produrre IL-2 e di proliferare. La dimostrazione finale e più determinante è stata offerta dagli esperimenti di ChIP, condotti su cloni Th17 con mAb anti-RORC, che hanno chiaramente dimostrato il legame diretto tra RORC e il TRE del promotore di IL4I1. L'altro possibile candidato coinvolto nella regolazione della proliferazione dei linfociti Th17 è la proteina Tob1. La proteina Tob1 è un membro della famiglia

Tob/BTG, da tempo conosciuta per la sua funzione anti-proliferativa [97,98]. Nei linfociti T CD4+, Tob1 viene degrada rapidamente nelle fase G1 precoce per garantire la progressione del ciclo cellulare. Alti livelli di tale proteina determinano un effetto inibitorio. In questo studio, abbiamo trovato che anche l'espressione di Tob1 è fortemente up-regolata nelle cellule Th17 rispetto alle cellule Th1, come dimostra l'analisi microarray confermata in PCR quantitativa. Studi recenti hanno evidenziato che Tob1 è espressa ad alti livelli nei linfociti T quiescenti, e che tale proteina controlla la progressione del ciclo cellulare agendo su vari fattori promuovendone o riducendone la loro sintesi [92]. Per confermare tali dati della letteratura scientifica abbiamo valutato i livelli della ciclina A, ciclina B, ciclina D, CDK2 e p27kip1. Dai nostri esperimenti è stato evidenziato che i linfociti Th17 mostrano livelli diminuiti delle varie cicline e della CDK2 rispetto ai linfociti Th1, mentre si osserva il contrario per l'espressione della p27kip1. Questi dati, dunque, mostrano chiaramente che gli alti livelli della proteina Tob1 presenti nei linfociti Th17 sono strettamente legati al controllo della progressione del ciclo cellulare. Inoltre, da questo studio è emerso che i linfociti Th17 mostrano bassi livelli dell'espressione della Skp2, la quale interagisce con Tob1 promuovendone la sua degradazione attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma [93]. Il meccanismo responsabile di tale riduzione rimane ancora da chiarire, ma probabilmente è attribuibile agli alti livelli di espressione della proteina Tob1 presenti nei linfociti Th17. E' da notare che la bassa espressione di Skp2, nelle cellule Th17, può ulteriormente spiegare recenti dati della letteratura scientifica, in cui si dichiara che le cellule Th17 presentano una ridotta proliferazione e produzione di IL-2 a causa di un aumento dell'espressione del fattore di trascrizione 1 della classe O Forkhead (FOXO1) che gioca un ruolo chiave nell'arresto della

proliferazione cellulare ed induzione di morte apoptotica [99]. Dai nostri esperimenti è stato anche evidenziato che esiste una correlazione tra IL4I1 e Tob1, infatti il silenziamento di IL4I1 in cellule Th17 è in grado di indurre una significativa diminuzione dell'espressione della proteina Tob1 mentre non aveva nessun effetto sui livelli di espressione della Skp2. Da un altro punto di vista, il silenziamento di Tob1 in cloni Th17, ha determinato un notevolmente aumento dell'espressione di IL-2 nonché un ripristino della proliferazione cellulare. Questo risultato ci ha dunque portato a confermare la nostra ipotesi secondo la quale l'elevata espressione di IL4I1 mantiene elevati i livelli della proteina Tob1 suggerendo un ulteriore meccanismo di non risposta proliferativa delle cellule Th17. Questi dati trovano conferma con i dati della letteratura scientifica in cui è stato dimostrato che in soggetti con alto rischio di sviluppare sclerosi multipla vi è una bassa espressione della proteina Tob1 [100]. Inoltre, recentemente, è stato indagato il ruolo di Tob1 in EAE, un modello murino che riproduce molti degli aspetti clinici, immunologici ed istopatologici della sclerosi multipla. In questi studi si evince, che topi knockout per Tob1^{-/-} mostrano un peggioramento di gravità della malattia. In questi modelli si nota, infatti, una maggiore infiltrazione di cellule Th1 e Th17 e una maggiore infiammazione del sistema nervoso centrale, a differenza delle cellule T regolatorie che invece subiscono una notevole diminuzione [101]. Questi dati, dunque, forniscono un'ulteriore spiegazione del ruolo svolto dalla proteina Tob1 in questa patologia che colpisce il sistema nervoso centrale e il suo possibile coinvolgimento in altri processi infiammatori Th17 dipendenti.

Al momento, possiamo affermare che le cellule Th17 umane differiscano da altre sottopopolazioni di effettori T CD4⁺, poiché, dopo la stimolazione, possiedono un

blocco della produzione di IL-2 e della conseguente risposta proliferativa, mantenendo, tuttavia, la capacità di produrre IL-17A.

Le cellule Th17 rivestono un importante ruolo protettivo e pro-infiammatorio, grazie alla loro capacità di produrre citochine a loro volta attive su diversi tipi cellulari appartenenti o meno al sistema immune. La compromissione della proliferazione cellulare, basata sul blocco della catena di eventi che parte dalla stimolazione del TCR, alla produzione autocrina del fattore di crescita linfocitario, la IL-2, può quindi rappresentare un importante meccanismo di autoregolazione dell'espansione delle cellule Th17 a livello dei tessuti infiammati. Ciò è stato confermato, anche se indirettamente, dall'osservazione che anche cellule Th17, isolate da SF di pazienti JIA [72] o circolanti derivate ex-vivo da soggetti sani, presentano le stesse anomalie nella produzione di IL-2 e nella capacità di proliferare riscontrate su cloni Th17. L'ipotesi che l'evidente attenuazione dell'espansione delle cellule Th17 rifletta un meccanismo per attenuare la loro potenziale pericolosità è coerente con l'osservazione che queste cellule, una volta attivate, tendono a virare verso il fenotipo Th1 come dimostrato sia nell'uomo che nel modello murino.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Silverstein A.M. (1989), A history of immunology. Academic Press, San Diego.
2. Abbas A.K. et al. (1994), Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia Pennsylvania 2nd edit.
3. Delves P.J. et al. (2000), The immune system. *The New England Journal of Medicine*, 343: 37-39.
4. Klein J. (1999), Self non-self discrimination, histoincompatibility, and the concept of immunology. *Immunogenetics. Review*, 50 (3-4): 116-23.
5. Nemazee D. (2000), Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 18: 19-51.
6. Sprent, J. et al. (1989), T lymphocytes and thymus. New York: Raven Press.
7. Ledbetter J. et al. (1981), Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocytes helper/inducer and cytotoxic suppressor subpopulations in mouse and man. *The Journal of Experimental Medicine*, 153:310.
8. Kamradt T. et al. (2001), Tolerance and Autoimmunity. *The New England Journal of Medicine*, 344,9: 655-664.
9. Sprent J. et al. (1995), Central tolerance of T cells. *International Reviews of Immunology*, 12: 95-105.
10. Reinisch C. et al. (1989), Evolutionary immunobiology. *Immunobiology Today*, 10: 278-281.
11. Fisher K et al. (2005), Isolation and characterization of human antigen-specific TCRab+CD4-CD8- double negative regulatory T cell. *The Journal of Immunology*. 105: 2828-2835
12. Mosmann, T. et al. (1986), Two types of murine helper T cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*,136:2384-2357.
13. Romagnani, S. (1991). Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunobiology Today*, 12: 256-257.
14. Murphy E. et al. (1996), Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 183: 901-913.
15. Infante-Duarte C. et al. (2000), Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *The Journal of Immunology*, 165: 6107-6115.

- 16.** Nurieva R.I. et al. (2009), Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* (New York, NY), 325: 1001–1005.
- 17.** Eddahri F. et al. (2009), Interleukin-6/ STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood*, 113 (11): 2426–2433
- 18.** Eto D. et al. (2011), IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS one*, 6: e17739.
- 19.** Crotty S. (2011), Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology*, 29: 621–663.
- 20.** Tangye S.G. et al. (2013), The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13: 412–426.
- 21.** King C. (2009), New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nature reviews Immunology*, 9: 757–766.
- 22.** Ma C.S. et al. (2012), The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine*, 209: 1241–1253.
- 23.** Sakaguchi S. et al. (1995), Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains. *The Journal of Immunology*, 155: 1151-1164.
- 24.** Annunziato F. et al. (2002 August), Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 196(3): 379-87.
- 25.** Sakaguchi S. et al. (2004), Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annual Review of Immunology*, 22: 531-62.
- 26.** Scheffold A. et al. (2005), Regulation of CD4+ CD25+ regulatory T cell activity: it takes IL-2 to tango. *European Journal of Immunology*, 35: 1336-1341.
- 27.** Fabian B. et al. (2011 October), Next-generation insights into regulatory T cells: expression profiling and FoxP3 occupancy in Human *Nucleic Acids Research*, 39(18): 7946–7960.
- 28.** Le Brans J. et al. (2006), Ipex and the role of Foxp3 in the development and function of human T regs. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6): 1473-5.
- 29.** Sakaguchi S. et al. (1995), Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155: 1151-1164.

- 30.** Seder R. A. et al. (1994), Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annual Review of Immunology*, 12: 635-673.
- 31.** Hsieh D.S. et al. (1993), Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260: 547-549.
- 32.** Snapper et al (1987), Interferon γ and B cell stimulatory factor -1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 256: 944-947.
- 33.** Stevens T. L. et al. (1988), Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1 and Th2- stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature*, 334: 255-258.
- 34.** Fiorentino D. F. et al. (1989), Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, 170: 2081-2095.
- 35.** Romagnani S. (1994), Lymphokine production by human T-cells in disease states. *Annual Review of Immunology*, 12: 227-257.
- 36.** Zhu J. et al. (2001), Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *The Journal of Immunology*, 166: 7276-7281.
- 37.** Zhu J. et al. (2003), Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19: 739-748.
- 38.** Zhu J. et al. (2004), Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nature Immunology*, 5 (11): 1157-1165.
- 39.** Corthay, A. (2006), A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64: 93-96.
- 40.** Punnonen J. et al. (1997), The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100: 729-801.
- 41.** Ricci M. et al. (1997), IL-4 as a key factor influencing the development of allergen-specific Th2-like cells in atopic individuals. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 7: 144-150.
- 42.** Maeda S. et al. (2001), Inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13). *Nippon Rinsho*. 59: 1894-1899.
- 43.** Venkaya R. et al. (2002), The lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26: 202-208.
- 44.** Kuo H.P. et al. (2001), Interleukin-5 in growth and differentiation of blood eosinophil progenitors in asthma: effect of glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology*, 134: 1539-1547.

- 45.** Sirling R.G. et al. (2001), Interleukin-5 induces CD34⁺ eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 164: 1539-1547.
- 46.** Bettelli E. et al. (2001), Th17 cell in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology*, 4: 345.
- 47.** Infante-Durante et al. (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.*, 165: 6107-6115.
- 48.** Constantinescu C.S. et al. (1998), Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 16: 5097 – 5104.
- 49.** Gran , B. et al. (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J. Immunol.*, 169 : 7104 – 7110.
- 50.** Aggarwal, S. & Gurney, A.L. (2000) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.*; 71: 1–8.
- 51.** Moseley, T.A. et al. (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14: 155–174.
- 52.** Kolls, J.K. & Linden, A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immun.*, 21: 467–476.
- 53.** Fossiez F et al. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp.Med.*, 183: 2593-2603.
- 54.** Ye, P. et al. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med*, 194: 519–527.
- 55.** Park H. Et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol*, 6: 1133-1141.
- 56.** Nakae, S. et al. (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 171: 6173–6177.
- 57.** Komiyama, Y. et al. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 177: 566–573.
- 58.** Langrish CL et al. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202: 96-105.
- 59.** Langrish CL et al. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*, 201: 233-240.

- 60.** Ivanov, I.I. et al. (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*,126: 1121–1133.
- 61.** Dzhagalov, I. et al. (2004) The roles of orphan nuclear receptor in the development and function of immune system. *Cell. Mol. Immunol.*, 1: 401-407.
- 62.** Harrington L.E. et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.*, 6: 1123-1132.
- 63.** Annunziato F. et al. (2009) Th17: Mice versus men. *Eur. J. Immunol.*, 39: 634-675.
- 64.** Annunziato F. et al. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204: 1849-1861.
- 65.** Santarlasci V. et al. (2009) TGF-beta indirectly favours the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol.*, 39:207-15.
- 66.** Cosmi L. et al. (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD4+CD161+ T cell precursor. *J. Exp. Med.*, 8: 1903-1916.
- 67.** Rosen D.B. et al. Cutting edge: lectine-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR1A receptor. *J. Immunol.* 2005; 175: 7796-7799.
- 68.** Poggi A. et al. NKR1A molecule is involved in transendothelial migration of CD4+ human T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 1997; 57: 121-123.
- 69.** Poggi A. et al. IL-12 mediated NKR1A up-regulation and consequent enhancement of endothelial transmigration of V δ 2 TCR γ δ + T lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients. *J. Immunol.* 1999; 162: 4349-4354.
- 70.** Matesevicius D. et al. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*5: 101-104
- 71.** Annunziato F. et al. (2013), Main features of human T helper 17 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1284: 66-70
- 72.** Cosmi L. et al. (2011), Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 63(8): 2504-15.
- 73.** Kroenke MA et al. (2009) IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.* 205: 1535-1541.
- 74.** Luger D. al. (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J. Exp. Med.* 205: 799-810.

- 75.** Haak S. et al. (2009) IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J. Clin Invest.* 119(1):61-69.
- 76.** Kullberg MC et al. (2006) IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J. Exp Med.* 203(11): 2485-2494.
- 77.** Wong C. K. et al. (2000) Elevation of proinflammatory cytokine (IL-8, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 9: 589-593.
- 78.** Karasawa et al. (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43: 2455-2463.
- 79.** Nielsen O.H. et al. (2003) Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 38: 180-185.
- 80.** Fujino S. et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
- 81.** Albanesi C. et al. (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effect with IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 162: 494-502.
- 82.** Kotake S. et al. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103: 1345-1352.
- 83.** Honorati M.C. et al. (2001) High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. *Reumatology.* 40: 522-527.
- 84.** Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 417-34.
- 85.** Baserga R. The biology of Cell Reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press 1985.
- 86.** Hartwell L.H. et al. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* 11;183(120): 46-51.
- 87.** Kong M, et al. (2000) Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO Journal.* 19(6):1378-88.
- 88.** Fung, T. K. et al. (2005) A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 16(3):335-342.
- 89.** Karp G. (2005). Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, Fourth ed, pp. 148, 165-170, and 624-664. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

- 90.** Cosmi L. et al. (2014) T Helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. 85(1): 36-42.
- 91.** Boulland M.L. et al. (2007), Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood*. 110, 220-227.
- 92.** Tzachanis D. et al. (2001) Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat. Immunol.* 2: 1174–1182.
- 93.** Suzuki T. et al. (2002) Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes Dev.* 16: 1356–1370.
- 94.** Ouyang W. et al. (2008), The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28: 454-467
- 95.** Annunziato F. et al. (2012), Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in Immunology*, 33(10): 505-12
- 96.** Chu, C.C., Paul, W.E. (1997), an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 2507-12.
- 97.** Tzachanis, D. and Boussiotis, V. A., (2009) Tob, a member of the APRO family, regulates immunological quiescence and tumor suppression. *Cell Cycle* 8: 1019–1025.
- 98.** Jia, S. and Meng, A. (2007) Tob genes in development and homeostasis. *Dev. Dyn.* 236: 913–921.
- 99.** Huang, H. et al. (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1649–1654.
- 100.** Corvol, J. C. et al. (2008) Abrogation of T cell quiescence characterizes patients at high risk for multiple sclerosis after the initial neurological event. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:11839–11844.
- 101.** Schulze-Topphoff, U. et al. (2013) Tob1 plays a critical role in the activation of encephalitogenic T cells in CNS autoimmunity. *J. Exp. Med.* 210: 1301–1309.