

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Emato-Oncologia e Medicina Interna Clinico Traslazionale
Malattie autoimmuni e autoinfiammazione: Aspetti fisiopatologici e diagnostici

XXXIII CICLO



Correlazione dei livelli sierici di IL-21 con autoanticorpi IgA anti -tTG e danno mucosale in pazienti affetti da malattia celiaca

Coordinatore: Prof. Edoardo G. GIANNINI

Tutore: Prof. Daniele SAVERINO

Tesi di:
Erika IERVASI

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

- SCOPO DEL LAVORO	pag.2
- CAPITOLO 1	pag.6
1.1 Le patologie autoimmuni	
1.1a La storia naturale e gli stadi della malattia autoimmune	
1.2 L'importanza del sesso nelle malattie autoimmuni	
1.3 L'implicazione della genetica e dell'ambiente nello sviluppo delle malattie autoimmuni	
1.4 La diagnostica: l'importanza degli auto-anticorpi	
- CAPITOLO 2	pag.21
2.1 Il sistema immunitario e i pathway coinvolti nell'autoimmunità	
2.2 Le cellule Th17: caratteristica e funzione	
2.3 La relazione tra le cellule Th17 e le cellule Treg	
2.4 Il ruolo delle Th17 nell'intestino	
2.5 Le cellule Tfh	
- CAPITOLO 3	pag.33
3.1 L'IL-21: struttura e funzione	
3.2 Il ruolo dell'IL-21 nelle cellule T	
3.3 L'IL-21 e la sua interazione con le CD8+	
3.4 IL-21 e NK	
3.5 Ruolo dell'IL-21 nella funzione delle cellule B	
3.6 L'IL-21 inibisce la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche (DC)	
3.7 IL-21 ed Autoimmunità	
- CAPITOLO 4	pag.39
4.1 IL-21 e celiachia: la loro correlazione	
MATERIALI E METODI	pag.44
RISULTATI	pag.47
DISCUSSIONE	pag.52
BIBLIOGRAFIA	pag.56

SCOPO DEL LAVORO

Numerose patologie pur sviluppandosi in assenza di una minaccia esterna come per esempio un'infezione, esposizione a tossine o predisposizione per la formazione di tumori, tendono a sviluppare una condizione infiammatoria e un danno specifico a livello tissutale con conseguente attivazione del sistema immunitario. Tali condizioni mostrano l'attivazione del sistema immunitario innato e un eccesso di mediatori infiammatori, ma nessuna evidenza di una risposta immunitaria antigene-specifica.

In alternativa, ci sono malattie caratterizzate da un'attivazione della risposta immunitaria adattativa con linfociti T e B che rispondono all'autoantigene in assenza di qualsiasi aggressione microbica o invasione tumorale rilevabile; queste patologie costituiscono la stragrande maggioranza delle malattie considerate di origine autoimmune. Attualmente sono state identificate circa 80 malattie di natura autoimmune che colpiscono il 5,7% della popolazione anche se dagli ultimi dati emersi in letteratura, la loro incidenza è in aumento.

Si definisce patologia autoimmune, quella condizione in cui il danno tissutale è causato dalla reattività delle cellule T o degli anticorpi reattivi verso antigeni propri. In alcuni casi, si presume che una malattia sia di origine autoimmune solo perché i linfociti B e T sono presenti nel tessuto colpito. I modelli animali per lo studio di queste patologie, sono stati estremamente utili per aiutare a comprendere sia i meccanismi che guidano l'insorgenza della malattia che quelli della patogenesi.

Due sono gli elementi importanti per comprendere l'alta frequenza delle malattie autoimmunitarie: in primo luogo, l'autoreattività. Infatti, il repertorio dei linfociti immunocompetenti che fornisce l'immunità protettiva è selezionato in base all'autoreattività. La regolazione dell'autoreattività aiuta a modellare il sistema immunitario in modo che essa non diventi associabile al danno tissutale, questo richiede una vigilanza costante. Il sistema immunitario mantiene un equilibrio precario tra i due: una risposta troppo scarsa porta a un potenziale non riconoscimento del "pericolo", mentre una risposta sovraespressa può potenzialmente portare all'autoreattività. In secondo luogo, esiste una predisposizione genetica all'autoimmunità e aspetti di questa predisposizione possono essere simili per molte malattie autoimmuni differenti. La malattia autoimmune quindi non richiede solo autoreattività, ma può anche essere influenzata dalla vulnerabilità genetica dell'organo bersaglio.

Alcuni dei recenti studi sulle basi genetiche dell'autoimmunità mostrano che i fattori genetici che regolano la vulnerabilità di organi specifici sono distinti da quelli che regolano l'autoreattività.

Pertanto, gli individui possono condividere percorsi che promuovono l'autoreattività, ma presenti con diverse malattie autoimmuni.

La celiachia (CD) per esempio è una malattia sistemica immuno-mediata indotta dalla presenza del glutine in soggetti geneticamente predisposti, caratterizzata da una reazione autoimmune contro la transglutaminasi tissutale (tTG), un enzima che deamina la gliadina nei soggetti portatori degli alleli HLA-DQA1 e DQB1 e per gli eterodimeri DQ2 o DQ8. La celiachia si manifesta con una condizione di malassorbimento cronico: il tipico danno intestinale è caratterizzato dalla distruzione dei villi e dall'iperplasia delle cripte, ma oggi è possibile tenerlo sotto controllo con l'eliminazione del glutine dalla dieta. A livello molecolare è stato dimostrato che l'esposizione alla gliadina (una prolamina che insieme alla glutenina costituisce il glutine) induce una risposta infiammatoria che causa il danno dei villi che rivestono l'intestino tenue (atrofia dei villi).

Il potenziale paziente celiaco è caratterizzato da un'alta espressione di IL-10 e da un aumento significativo del rapporto IL-10/IFN- γ , seguito poi da una maggiore densità di cellule regolatorie come CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T reg, che esercitano effetti soppressivi. Sebbene sia riconosciuto che la CD sia mediata da una risposta Th1, non è ancora chiaro il meccanismo per cui le cellule Th1 siano indotte e mantenute nell'intestino dei pazienti. Le prove indicano che una interazione attiva e dinamica tra cellule immunitarie e non, ha un ruolo cruciale nell'iniziare e nel modellare questo pathway patologico, e che le citochine siano i mediatori principali di questo dialogo incrociato. In particolare, l'IL-21 pare avere un ruolo chiave in questo fenomeno: la sua espressione, infatti, è risultata maggiore nella mucosa intestinale di pazienti con CD attivo (sia pediatrici che adulti) rispetto a quella di pazienti CD trattati con una dieta priva di glutine e a quella di soggetti controllo.

L'IL-21 è una citochina fortemente coinvolta nei meccanismi dell'infiammazione e in quelli dell'autoimmunità, con relativo coinvolgimento nello sviluppo e mantenimento di specifiche classi dei linfociti T (CD4⁺ e CD8⁺) e dei linfociti B.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di approfondire ed analizzare il possibile ruolo di questa citochina nello sviluppo della celiachia. In particolare ci siamo occupati di valutare dal punto di vista quantitativo la relazione tra i livelli sierici dell'IL-21 e i titoli sierici degli autoanticorpi IgA anti-tTG con relativo confronto del danno tissutale che viene a manifestarsi a livello della mucosa duodenale in pazienti considerati attivi.

In questo studio sono stati analizzati i sieri di 160 pazienti CD, 120 non trattati e 40 trattati (sottoposti a dieta priva di glutine), e quelli di 45 volontari sani, con funzione di controllo.

I risultati hanno dimostrato che i pazienti CD alla diagnosi esprimevano concentrazioni di IL-21 significativamente più elevate rispetto ai pazienti CD sottoposti a dieta e ai controlli. Inoltre i dati ottenuti, hanno dimostrato una correlazione positiva tra i livelli di IL-21 e le concentrazioni di autoanticorpi IgA anti-tTG, indice di un possibile ruolo di questa citochina nell'attivazione dei linfociti B. Infine, si è evidenziata una correlazione positiva dei livelli di IL-21 con il danno alla mucosa duodenale: questo ci ha permesso di ipotizzare la possibilità di un forte effetto immunomodulatore dell'IL-21 sulle funzioni dei linfociti T citotossici.

Questo studio fornisce un'ulteriore prova dei dati emergenti sul potenziale ruolo dell'IL-21 nella patogenesi della CD, suggerendo il suo coinvolgimento nello sviluppo e nella progressione della CD.

CAPITOLO 1

1.1 Le patologie autoimmuni

Le malattie autoimmuni sono condizioni patologiche differenti per importanza clinica, rilevanza epidemiologica, meccanismi fisiopatologici ma accomunate dal ruolo patogenetico di reazioni immunologiche conseguenti a fenomeni di auto-riconoscimento da parte del sistema immunitario.

Colpiscono il 5-10% della popolazione e tutti gli organi possono diventare possibile bersaglio per una reazione autoimmune, in quanto la condizione necessaria per una patologia autoimmune è quella di sviluppare una auto-aggressione nei confronti di organi self del nostro organismo, la cosiddetta *risposta immunitaria adattativa auto-reattiva*.

Le funzioni di riconoscimento del self e del non self da parte del sistema immunitario vengono svolte attraverso un elaborato sistema di identificazione che coinvolge i linfociti T e i linfociti B, che hanno la capacità di riconoscere antigeni specifici e le cellule presentanti l'antigene che appartengono al sistema dei fagociti mononucleati. Quando nell'organismo entrano delle sostanze estranee, il sistema immunitario non le riconosce come proprie e quindi organizza contro di esse una risposta complessa finalizzata alla loro neutralizzazione ed eliminazione.

L'antigene particolato viene dunque incorporato e degradato dai macrofagi e dalle cellule dendritiche dando origine a dei frammenti peptidici (proteolisi intracellulare) che andranno a legarsi con molecole identificate dal complesso maggiore di istocompatibilità - MHC (detto anche HLA). I complessi peptidi-HLA sono dunque espressi sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), determinando così l'attivazione dei linfociti T-helper o CD4⁺. I peptidi legati alle molecole HLA di classe I e di classe II sono i ligandi per i recettori specifici dei linfociti T (TCR) citotossici (CD8⁺) o CD4⁺. L'attivazione e la proliferazione delle cellule CD4⁺, comporterà il rilascio di citochine che invieranno segnali specifici per le cellule effettrici rappresentate dai linfociti T citotossici e dai linfociti B.

Le citochine influenzano non solo l'attivazione e la proliferazione delle cellule effettrici ma anche la qualità della risposta immunologica. Esistono infatti due tipi funzionali di cellule T-helper, le Th1 e le Th2: le prime producono l'interferone gamma (IFN- γ) e l'IL-2 che orientano i meccanismi effettori verso una risposta di tipo prevalentemente cellulare (linfociti T CD8⁺, o citotossici); le seconde invece producono l'IL-4 e l'IL-10 e orientano le risposte effettrici in senso umorale andando quindi ad attivare in modo specifico le cellule B. La risposta immunitaria finale sarà dunque l'interconnessione tra cellule effettrici che riconoscono l'antigene iniziale e l'attività di diverse sottopopolazioni linfocitarie.

1.1a Storia naturale e stadi della malattia autoimmune

La storia naturale delle malattie autoimmuni è molto articolata e si compone di tre fasi ben differenziate: potenziale, subclinica o latente, clinica.

La *potenziale* è la fase in cui la malattia non è clinicamente espressa ma vi è un'elevata probabilità che ciò si verifichi. Può essere considerato affetto da malattia autoimmune potenziale il soggetto con assetto genetico di predisposizione oppure il soggetto sano del quale si documenta la presenza di autoanticorpi circolanti a titolo significativo.

La malattia autoimmune nello *stadio subclinico*, fa riferimento ad un soggetto apparentemente sano nel quale siano stati trovati titoli significativi di autoanticorpi e nel quale possono essere dimostrabili:

- 1) infiltrati linfocitari diffusi o multifocali, depositi di immunoglobuline e/o di complemento a livello dell'organo affetto;
- 2) alterazioni subcliniche della funzione dell'organo coinvolto svelabili mediante test specifici dal punto di vista funzionale.

Il gruppo dei soggetti anticorpo-positivi tende ad evolvere verso la malattia con una progressione lenta ma costante e con una percentuale significativa rispetto al gruppo di controllo anticorpo-negativo.

A causa di questo andamento rivolto ad una evoluzione della malattia di natura clinica, nei soggetti positivi è opportuno ripetere con una certa frequenza i test funzionali per identificare per tempo coloro che evolvono verso la malattia conclamata.

La malattia autoimmune *clinica* è la condizione in cui la patologia si manifesta con tutto il suo corteo sintomatologico. Ciò avviene quando la maggior parte dell'organo bersaglio risulta funzionalmente danneggiato in modo irreversibile. Possono comparire sintomi clinici transitori qualora in un soggetto con malattia subclinica si sovrappongono eventi precipitanti (stress, infezioni ecc.) che richiedono un aumento di attività da parte dell'organo bersaglio, che però in queste condizioni non è in grado di fare. Tali situazioni sono da considerarsi come dei campanelli di allarme che permettono di stabilire una diagnosi precoce. Le manifestazioni cliniche quindi si possono presentare in forma acuta o cronica, a seconda che il parenchima si deteriori rapidamente o lentamente, oppure quando il fabbisogno aumenta bruscamente o gradualmente.

La storia naturale della malattia è condizionata da numerosi e complessi fattori come il volume dell'organo bersaglio, la sua capacità di compenso al danno tramite meccanismi di rigenerazione specifici o aspecifici, l'entità e l'aggressività dei fenomeni autoimmuni, la variabilità individuale ed altri fattori non ancora identificati.

Per essere considerata autoimmune, la patologia deve almeno rispettare uno di questi criteri:

- Presenza di infiltrati linfocitari che a seconda del tipo di malattia (organo o non-organo specifica) possono essere localizzati nell'organo bersaglio o diffusi a livello di diversi apparati o di tutto l'organismo;
- Presenza di autoanticorpi circolanti e/o localizzati a livello dell'organo bersaglio;
- Possibilità di riprodurre nell'animale da esperimento la malattia, inoculando estratti tissutali dell'organo bersaglio o gli specifici autoantigeni purificati;
- Possibilità di trasferire passivamente la malattia dall'animale affetto ad un altro sano dello stesso ceppo, mediante trasporto passivo di siero e/o di linfociti;
- Efficacia della terapia immunosoppressiva.

A questo punto è possibile dettare un'ulteriore classificazione delle patologie autoimmuni a seconda del distretto che viene colpito. Possiamo quindi parlare di **malattie organo-specifiche, intermedie e sistemiche**.

- *Malattie organo-specifiche*

Prevedono l'interessamento di un singolo organo o apparato, caratterizzato dalla presenza di infiltrati linfomonocitari a livello dell'area interessata, produzione di anticorpi e risposta da parte delle cellule T diretta verso cellule di un singolo organo bersaglio. Le lesioni possono essere provocate da immunoreazioni di tipo II, IV e V, per lo più caratterizzate da una distruzione a cui consegue l'ipofunzione dell'organo (raramente da iperfunzione). Esempi classici appartenenti a questo gruppo sono le tiroiditi croniche, il morbo di Graves e quello di Addison.

- *Malattie intermedie*

Caratterizzate da infiltrati linfocitari limitati ad un singolo organo o apparato ma nelle quali l'autoimmunità umorale è diretta contro auto-antigeni non organo-specifici e le immunoreazioni sono mediate da meccanismi di tipo II, III, IV.

- *Malattie non organo-specifiche o sistemiche*

Interessamento sistemico dell'organismo come conseguenza di una reazione autoimmune contro antigeni ubiquitari. Le malattie autoimmuni sistemiche sono delineate da autoanticorpi specifici per

molecole nucleari e citoplasmatiche coinvolte nella replicazione e trascrizione del DNA e nella traduzione di mRNA. Alcune manifestazioni delle malattie autoimmuni sistemiche sono dovute all'effetto diretto di questi autoanticorpi, mentre altre sono dovute alla deposizione, specie nei glomeruli renali, di complessi antigeni-anticorpo. Un esempio di questo tipo di malattia è il LES.

1.2 L'importanza del sesso nelle malattie autoimmuni

Un fattore che è risultato avere un ruolo funzionale nella classificazione nonché diagnosi delle patologie autoimmuni è il sesso, in particolare si è visto che una percentuale più alta del sesso femminile sviluppa patologie autoimmuni quali per esempio l'artrite reumatoide e la sindrome di Sjögren [1]. Le differenze sessuali nella risposta immunitaria sono responsabili di molti aspetti delle malattie autoimmuni come la produzione massiccia di autoanticorpi e la deposizione di immunocomplessi con conseguenti danni ai tessuti e auto-infiammazione specifica per organo.

Uno dei primi studi ad analizzare il coinvolgimento del sesso, dal punto di vista epidemiologico, è stato condotto dal gruppo di Beeson nel 1994 [2] successivamente Jacobson e collaboratori hanno confermato che il sesso femminile avesse una percentuale di rischio 2,7 volte maggiore rispetto agli uomini nello sviluppare una delle 24 malattie autoimmuni all'epoca conosciute e che circa l'80% di tutti i pazienti analizzati con manifestazione di malattie autoimmuni negli Stati Uniti dal 1965 al 1995 erano donne. Una valutazione più recente delle differenze sessuali analizzata da Hayter e Cook è giunta a una conclusione simile a quella del gruppo Jacobson (Fig.1): le 5 malattie autoimmuni più diffuse, l'artrite reumatoide, la tiroidite di Hashimoto, la celiachia, la malattia di Graves e il diabete di tipo I, sono più frequenti nel sesso femminile.

Autoimmune Disease	Prevalence (per 10 ⁵)	Ratio of women to men (% women)
Rheumatoid arthritis	860	3:1 (75%)
Hashimoto's thyroiditis	792	19:1 (95%)
Celiac disease	750	1.3:1 (57%)
Graves' disease	629	7:1 (88%)
Type 1 diabetes	480	1:1.2 (45%)
Multiple sclerosis	58	2:1 (64%)
Systemic lupus erythematosus	32	7:1 (88%)
Ulcerative colitis	30	2:1 (65%)
Crohn's disease	25	1:1.4 (40%)
Scleroderma	24	12:1 (92%)
Autoimmune hepatitis type 1	17	4:1 (78%)
Sjögren's syndrome	14	16:1 (94%)
Myositis	5	2:1 (67%)
Myocarditis	-	1:3.5 (29%)

Fig. 1: schematizzazione del rapporto espresso in percentuale dello sviluppo delle malattie autoimmuni nel sesso femminile vs il sesso maschile [3]

Alcuni ormoni, quali gli estrogeni, il testosterone e il progesterone, sembrano essere coinvolti nella patogenesi delle malattie autoimmunitarie [4].

I recettori degli ormoni sessuali sono localizzati sulle membrane di diverse cellule del sistema immunitario tra cui cellule T, cellule B, monociti, macrofagi, cellule dendritiche (DC) e mastociti (MC), tuttavia solo i monociti, i macrofagi e i mastociti presentano recettori per gli estrogeni e per gli androgeni sia a livello nucleare che di membrana. A parte il loro ruolo nell'allergia, gli MC agiscono come cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare in potenziali siti di ingresso di antigeni estranei nell'ospite come la cute, l'intestino, i vasi sanguigni e il peritoneo [5]. L'estrogeno ha una ben nota capacità di aumentare le risposte anticorpali a vaccini, infezioni e autoantigeni attivando le cellule, mentre gli androgeni hanno l'effetto opposto [6, 7,8]. Pertanto a seconda del contesto, gli estrogeni possono o promuovere l'infiammazione migliorando le risposte Th1 o aumentare l'attività della risposta immunitaria adattativa promuovendo la tolleranza immunitaria, o indicando risposte immunitarie antinfiammatorie / regolatorie di tipo Th2

Interessante è anche il ruolo di estrogeno e progesterone nell'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) [9].

1.3 L'implicazione della genetica e dell'ambiente nello sviluppo delle malattie autoimmuni

Un ruolo importante è quello che viene svolto dalla genetica e dai fattori ambientali nello sviluppo delle patologie autoimmuni. Dei molti geni coinvolti, alcuni agiscono direttamente sulle cellule del sistema immunitario andando così ad alterare l'immuno-reattività dell'ospite (Fig. 2) ma questi stessi geni spesso non sono specifici per una sola malattia: non è raro infatti che i pazienti con LES o miosite autoimmune, abbiano una storia familiare con preponderanza di altre patologie sistemiche o specifiche dell'organo.

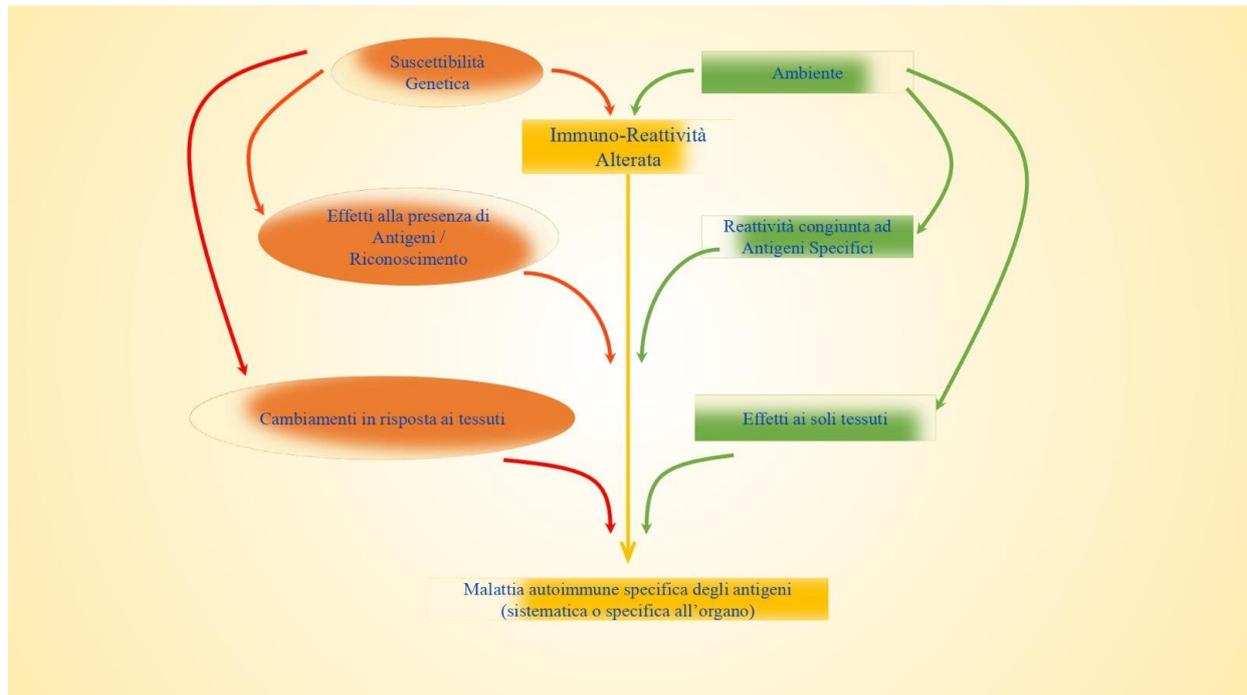


Fig.2: Fattori genetici ed ambientali che regolano ed influenzano i pathway autoimmuni.

Alcuni studi su modelli animali, allestiti per avere una visione migliore sull'andamento di alcune patologie come il diabete di tipo 1, tiroidite autoimmune, malattia di Addison, sindromi poliendocrine autoimmuni, vitiligine e celiachia, hanno dimostrato che esiste una base comune per lo sviluppo di più malattie di natura autoimmune. L'esempio più comune è quello dei topi NOD studiati prevalentemente per caratterizzare il diabete di tipo 1, ma che successivamente sono risultati costituire un buon modello anche per altre patologie autoimmunitarie organo-specifiche.

Studi di mappatura genetica supportano l'ipotesi che i singoli geni coinvolti nei disturbi autoimmuni possano ricoprire più ruoli, infatti i loci specifici studiati nei modelli murini di diabete di tipo 1, l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), l'artrite indotta e il lupus sono collocati sulla stessa mappa genetica e, allo stesso tempo vengono messi in evidenza le loro posizioni a livello umano. Questi studi hanno anche evidenziato che la sovrapposizione di più malattie autoimmunitarie si verifica più spesso del previsto. (Fig. 3).

Table 2 Representative gene manipulations associated with autoimmune diseases		
Effect	Gene products	Human disease counterpart
<u>Genes affecting overall immunoreactivity</u>		
Inhibition of apoptosis	Fas, Fas ligand, Bcl-2 (Tg)	SLE
B-cell activation	FcγRIIB, SHP-1, CD22, CD19, PD-1 Lyn, BLys-1(Tg)	SLE
T-cell activation/regulation	TGFβ, TGFβR, PD-1	SLE
Cell proliferation	p21 ^{WAF1/cip1} , Fli-1	SLE
Cytokines	IFN-γ (Tg), IL-4 (Tg), IL-10 (Tg)	SLE
	IL-2	IBD or AHA
	IL-10	IBD
	IL-1 receptor antagonist	RA
	TNF-α (Tg)	RA or MS
<u>Genes affecting autoantigen presentation/recognition</u>		
Autoantigen clearance	C1q, C4, SAP, DNase-1	SLE
Antigen presentation	HLA-DQ8 (Tg) (with ins- B7-1 (Tg))	Type 1 diabetes
Antigen recognition	KRN T cell receptor (Tg) with I-A ^{g7}	RA
Knockout mutations are shown unless indicated as transgenic (Tg) overexpression. IBD, inflammatory bowel disease. AHA, autoimmune hemolytic anemia.		

Fig. 3: Geni coinvolti nella manifestazione di patologie autoimmuni, con inibizione della clearance di autoantigeni implicati nei meccanismi di suscettibilità [10].

Non è chiaro ancora come gli stessi geni contribuiscano alla manifestazione delle diverse malattie, tuttavia l'evidenza suggerisce che lo stesso gene potrebbe essere coinvolto almeno in alcune patologie. Ad esempio, un polimorfismo nel gene che codifica per l'interleuchina (IL) -2 (mappato come Idd3) è associato sia allo sviluppo del diabete di tipo 1 nei topi NOD sia alla suscettibilità all'EAE; allo stesso modo un polimorfismo nel gene per CTLA-4, una proteina che inibisce l'attivazione delle cellule T, potrebbe essere associato alla predisposizione per il diabete di tipo 1, alla celiachia e alle malattie autoimmuni della tiroide [11,12] .

Gli studi con topi knockout e transgenici forniscono anche esempi di geni che hanno effetti a livello di sistema (Fig.3): ad esempio, la carenza di IL-2 può portare a malattia infiammatoria intestinale o anemia emolitica autoimmune a seconda del background genetico.

Nelle malattie organo-specifiche ad esempio l'associazione genetica maggiormente riconosciuta è quella con geni del complesso HLA, localizzato nel braccio corto del cromosoma 6, in particolare con quelli di classe II. Sono stati tuttavia riconosciuti anche altri geni di predisposizione situati al di fuori del sistema HLA, quali i geni dell'insulina, del recettore TSH, dei ligandi e dei recettori coinvolti nella risposta immunitaria.

Evidenze dirette e indirette del coinvolgimento di fattori ambientali nelle malattie autoimmuni umane sono state riportate in diverse patologie: i fattori esogeni possono essere infettivi (batterici o virali) e chimico-fisici.

L'ambiente può influenzare l'immuno-reattività dell'individuo per mezzo dello spostamento dell'equilibrio delle cellule T, in particolare tra le cellule Th1 che producono molecole infiammatorie, interferone (IFN) γ e le cellule Th2 che producono IL-4 – e IL-5.

Direttamente o indirettamente, le infezioni batteriche e virali di solito inducono il differenziamento delle cellule T in cellule Th1, al contrario, probabilmente a causa dei siti della mucosa che infettano, le infezioni da elminti spostano l'equilibrio verso le cellule Th2.

Le malattie autoimmuni come la sclerosi multipla, il diabete di tipo 1 e l'artrite reumatoide sono caratterizzate da un ruolo preponderante della risposta Th1; sebbene le citochine derivate da Th2 possano avere un ruolo nel lupus, le risposte INF- γ e Th1 sono fondamentali anche in questa malattia mediata da anticorpi: quindi le infezioni batteriche e alcune virali, spostando l'equilibrio delle cellule T verso Th1, dovrebbero predisporre l'individuo all'autoimmunità mentre le esposizioni elmintiche e altre, che inclinano l'equilibrio verso Th2, dovrebbero inibire la malattia autoimmune.

Tuttavia, ci sono diversi pareri contrastanti su questo punto e l'evidenza che solo le cellule Th1 possano causare la distruzione delle cellule coinvolte, (come nel caso del diabete di tipo 1) non è assolutamente incontrovertibile. Inoltre, ci sono alcune difficoltà epidemiologiche con l'idea considerando che nei paesi sviluppati, le infezioni batteriche siano diminuite di frequenza e l'asma - una malattia che si pensa sia guidata dalle cellule Th2 - è aumentata senza una concomitante diminuzione dell'incidenza della malattia autoimmune. Quindi, sebbene altri fattori come inquinanti chimici o infezioni da virus respiratori possano svolgere un ruolo, l'evidenza indica che il paradigma Th1 / Th2 per l'autoimmunità e, al contrario, l'asma, potrebbe essere una semplificazione eccessiva della realtà.

Gli agenti infettivi influenzano la capacità delle cellule T di rilevare auto-antigeni mediante reazione crociata (mimetismo molecolare). Come discusso in precedenza, gli agenti infettivi forniscono i propri coadiuvanti, quindi le risposte delle cellule T contro gli antigeni delle infezioni sono particolarmente vigorose. Se l'agente codifica per un peptide che è strettamente correlato a un peptide dell'ospite, tali risposte vigorose potrebbero indurre potentemente le cellule T che possono quindi reagire, in modo meno forte forse, ma comunque efficace, contro le cellule che portano l'antigene auto-reattivo. Questo tipo di ipotesi esiste da molti anni e ci sono ora prove considerevoli che a volte il mimetismo molecolare spieghi l'induzione dell'autoimmunità da parte delle infezioni

L'infiammazione può anche migliorare la presentazione dell'antigene da parte di cellule che normalmente non sono incluse in questa categoria: per esempio nell'uomo, l'infiammazione induce l'espressione di MHC di classe I / II e proteine costimolatorie (come CD40 e CD40 ligando) sulle cellule endoteliali ed epiteliali [13]. Una maggiore espressione di MHC da parte di tali cellule porterà a una maggiore esposizione alle cellule T dei peptidi da proteine espresse all'interno di queste cellule.

La nostra comprensione delle malattie autoimmuni è progredita enormemente negli ultimi 20 anni. Tuttavia, rimangono ancora inesplorati molti campi, in quanto esistono così tanti fenomeni diversi fra loro che influenzano la suscettibilità e l'evoluzione delle patologie stesse.

Possiamo però concludere dicendo che sia i geni ospiti che l'ambiente tendono ad influenzare l'incidenza e il tipo di malattia su più fronti.

1.4 Diagnostica: importanza degli auto-anticorpi

Gli studi compiuti sugli autoanticorpi hanno confermato l'importanza di quest'ultimi come i migliori predittori di diagnosi per le patologie autoimmuni. Verso la fine del XX secolo vennero introdotti due strumenti metodologici che presto divennero essenziali:

1. La capacità di raccogliere, archiviare, analizzare enormi quantità di dati dei pazienti realmente positivi.

2. Sviluppo in parallelo di più test d'analisi dei dati raccolti per poter così costruire una corretta classificazione dei sintomi e delle peculiarità che caratterizzavano ogni paziente affetto da quella specifica patologia autoimmune. Questo ampliamento del panorama scientifico nel primo decennio del XXI secolo ha permesso enormi progressi nella previsione delle malattie autoimmuni: la maggior parte delle patologie infatti si sviluppa per un lungo periodo di tempo in modo silente, tant'è vero che i pazienti vengono classificati come soggetti asintomatici. Inizialmente, in studi di associazione su tutto il genoma è stato possibile misurare una gamma e un numero crescenti di marcatori genetici di elevata suscettibilità ereditaria: insieme a una vasta gamma di marker immunologici e biochimici, il genoma può indicare che è in corso un processo autoimmune non regolamentato, potenzialmente distruttivo.

Sfortunatamente, in troppi casi, questi segni biologici non diventano diagnosticamente evidenti fino a quando non si è verificato un danno irreversibile ai tessuti. Il trattamento della malattia autoimmune si concentra ancora oggi sulla compensazione o sulla riparazione del danno già inflitto, cercando così di rendere migliore lo stato di salute futuro per il paziente stesso: un intervento precoce e sicuro basato

su previsioni affidabili, è la chiave per arrestare l'autoimmunità prima che progredisca in una condizione irreversibile.

Se associato all'analisi genomica, il miglior biomarcatore fino ad ora conosciuto è il titolo crescente e l'amplificazione degli autoanticorpi. [14]

Autoanticorpi e il loro significato clinico

Negli ultimi anni si sono scoperti molti degli autoantigeni coinvolti nelle reazioni autoimmuni che sono per lo più enzimi citoplasmatici, mitocondriali o nucleari, recettori di membrana od ormoni. È possibile suddividerli in tre gruppi principali in base alla loro capacità di indurre o meno lesioni:

- *Patogenetici*: sono correlati alla malattia ed al suo andamento, calano di titolo e scompaiono con la guarigione o la remissione, se persistono la malattia non guarisce, se si ripresentano la malattia è recidiva. Sono in grado di indurre la malattia sia *in vivo* che *in vitro*, non sono presenti nei soggetti sani. Tipico esempi sono gli anticorpi anti-recettore del TSH, anti-recettore periferici dell'insulina, anti-recettore dell'acetilcolina, anti-fattore intrinseco ecc..
- *Non patogenetici*: sono correlati alla malattia ma il loro titolo ed andamento è indipendente dall'evoluzione o dall'andamento della malattia stessa e possono essere dimostrati sia prima della sua comparsa che dopo molti anni dalla sua guarigione clinica; possono essere presenti in soggetti apparentemente sani senza che questi sviluppino la malattia, non sono in grado di riprodurla né in vivo né in vitro. Esempi di tali anticorpi sono quelli contro la tireoglobulina, tireoperossidasi, DNA, gli antigeni nucleo-estraibili, il muscolo liscio, il mitocondrio.
- *Epifenomeni*: possono formarsi di conseguenza di necrosi tissutali non immunologicamente mediate (vascolari, batteriche, virali ecc..) sono per lo più transitori, la malattia in cui si ritrovano non soddisfa nessun altro dei criteri fondamentali delle malattie autoimmuni. Un esempio è rappresentato dagli anticorpi anti-muscolatura liscia nelle epatiti e le anti-gamma globuline nelle infezioni.

CAPITOLO 2

2.1 Il sistema immunitario e i pathway coinvolti nell'autoimmunità

Le cellule del sistema immunitario derivano da cellule staminali ematopoietiche che si rinnovano automaticamente e che danno origine a progenitori multipotenti, i quali non sono più in grado di auto rinnovarsi [15]. Le citochine e altri segnali presenti nell'ambiente circostante, permettono l'espressione di diversi modelli di fattori di trascrizione [16] che guidano i progenitori multipotenti lungo particolari percorsi di differenziazione, portando infine alla generazione di linfociti, cellule natural killer (NK), cellule dendritiche (DC), neutrofilo, eosinofili, basofili, mastociti, monociti, macrofagi, megacariociti ed eritrociti.

Il sistema immunitario può attivare a seconda della situazione, due tipi di risposte: innata oppure adattativa (acquisita).

Il primo tipo viene a verificarsi tutte le volte che si viene ad incontrare un antigene mentre la seconda porta alla formazione di una memoria immunologica portando a risposte quantitativamente e qualitativamente migliori al successivo incontro con l'antigene. Entrambi i tipi di risposta rilevano una minaccia utilizzando propri recettori che riconoscono le molecole associate ai patogeni; le risposte innate mostrano un'ampia specificità basata sul rilevamento di modelli molecolari associati sia ai patogeni (PAMP) che ai modelli molecolari associati al danno (DAMP) da parte dei recettori di riconoscimento [17]. Importante è anche il legame che viene a formarsi con la classe di recettori per il complemento e i recettori Fc di antigeni opsonizzati rivestiti con complemento o anticorpo. Solo i linfociti, le cellule dedicate della risposta adattativa, presentano recettori antigene-specifici che consentono un riconoscimento altamente dettagliato nei confronti dei singoli antigeni. Ciascun linfocita infatti possiede circa 10⁵ recettori antigenici di identica specificità, invece il recettore delle cellule B (BCR) riconosce strutture (epitopi) sulla superficie dell'antigene nativo; gli epitopi riconosciuti dal recettore delle cellule T (TCR) sono peptidi più corti.

I peptidi d'altro canto non sono altro che prodotti dall'elaborazione proteolitica dell'antigene all'interno delle cellule e vengono presentati ai linfociti T da molecole di superficie cellulare di classe I e di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) altamente polimorfiche. Le principali molecole umane di classe I sono HLA-A, B e C e la classe II comprende HLA-DP, DQ e DR.

Le cellule della risposta immunitaria innata includono neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi e DC, che a vari livelli possono agire come cellule fagocitiche, insieme ai basofili non fagocitici, mastociti e cellule NK. Tutti questi tipi di cellule sono in grado di produrre mediatori infiammatori. L'individuazione di infezioni o lesioni ai tessuti può provocare l'attivazione di complessi molecolari intracellulari denominati inflammasomi, portando alla secrezione di mediatori proinfiammatori come le citochine interleuchina (IL) -1β e IL-18 [18]. L'immediata conseguenza di un incontro con un'entità che si ritiene rappresenti una minaccia, è la generazione di una risposta infiammatoria acuta in cui le cellule e le molecole del sistema immunitario vengono rapidamente reclutate nel sito dello stimolo. I mediatori dell'infiammazione e i prodotti microbici provocano una sovraregolazione delle molecole di adesione sull'endotelio vascolare, allertando così le cellule infiammatorie della presenza di un'infezione locale: l'istamina rilasciata dai mastociti provoca la contrazione della muscolatura liscia e un aumento del processo locale, innescando la degranolazione dei mastociti e attirando chemotatticamente i neutrofili. Le citochine chemiotattiche (chemochine) aiutano a guidare i neutrofili verso il sito dell'infezione [19]. La presenza sulla superficie delle cellule dei neutrofili di entrambi i recettori Fc per gli anticorpi e i recettori del complemento facilita notevolmente la fagocitosi se l'antigene è opsonizzato con questi agenti [20]. I microrganismi fagocitati vengono uccisi all'interno del neutrofilo grazie all'azione di molecole tossiche tra cui anioni superossido, radicali idrossilici, acido ipocloroso, ossido nitrico, proteasi, defensine e lisozima. Le trappole extracellulari dei neutrofili (NET) prevengono così la diffusione microbica e focalizzano le sostanze microbicide rilasciate su qualsiasi permeabilità vascolare, facilitando il passaggio dei neutrofili dal sangue ai tessuti. L'attivazione del sistema del complemento gioca un ruolo fondamentale nel caso di patogeni non fagocitati nelle immediate vicinanze dei neutrofili [21,22]. Sebbene gli eosinofili siano in grado di fagocitare i microrganismi, il loro ruolo nella protezione contro le infezioni è forse più specializzato verso il rilascio di granuli contenenti proteine cationiche al fine di distruggere i parassiti extracellulari come gli elminti. Gli eosinofili sono anche coinvolti nella regolazione immunitaria: secernono il leucotriene C₄, fattore di attivazione delle piastrine, e una serie di citochine e possono essere indotti a esprimere MHC di classe II e quindi agire come cellule presentanti l'antigene per l'attivazione delle cellule T [23]. I basofili del sangue e i mastociti tissutali non sono fagocitici e condividono molte caratteristiche. Diventano sensibilizzati con anticorpi IgE legati ai loro recettori Fc ϵ ad alta affinità (Fc ϵ RI) e, quando l'antigene reticola le IgE, rilasciano mediatori infiammatori preformati tra cui istamina, fattore di attivazione piastrinica e molte altre citochine. Vengono rilasciati anche leucotrieni, prostaglandine e trombossani di nuova sintesi. Nell'uomo sono state descritte due popolazioni di mastociti, quelle che contengono sia triptasi che chimasi (MCTC) e quelle prive di chimasi (MCT) [24]. Sono stati proposti numerosi ruoli immunoregolatori per i mastociti, a causa

delle particolari citochine e altri mediatori che secernono; macrofagi dei tessuti e i loro precursori circolanti, i monociti del sangue, possiedono sia recettori Fc che recettori del complemento e contengono sostanze microbicide simili ai neutrofili. Tuttavia, vivono molto più a lungo dei neutrofili e sono in grado di elaborare gli antigeni per la loro presentazione ai linfociti T helper. Un ruolo aggiuntivo del macrofago è la rimozione delle cellule morte o morenti nei diversi tessuti. Mentre il danno tissutale associato alla morte cellulare necrotica innesca l'infiammazione, le cellule che muoiono a causa dell'apoptosi vengono rimosse molto più silenziosamente. La perdita di simmetria della membrana è una caratteristica della morte cellulare per apoptosi ed espone la molecola fosfatidilserina sulla superficie cellulare, segnando la cellula per fagocitosi da parte dei macrofagi che esprimono i recettori della fosfatidilserina [25]. I macrofagi sono attori chiave nelle risposte infiammatorie, rilasciando citochine come IL-1 β e TNF α e sono particolarmente caratteristici dell'infiammazione cronica. Gli insiemi di recettori attivatori e inibitori sono espressi sulle cellule NK, alle quali consentono di rilevare le cellule che hanno perso o alterato la propria espressione delle molecole MHC self a seguito di infezione o oncogenesi. Un segnale dominante attraverso i recettori attivanti porterà all'induzione dell'apoptosi nella cellula bersaglio.

Le cellule NK possono anche mediare la citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi (ADCC) delle cellule bersaglio rivestite con anticorpi e sono una ricca fonte di alcune citochine, in particolare l'interferone gamma (IFN- γ). Quest'ultima attività conferisce un importante ruolo immunoregolatore alla cellula NK [26]. Un'interfaccia chiave tra le risposte innate e adattive è fornita dalle DC, una popolazione eterogenea che include le cellule di Langerhans nella cute: le DC campionano gli antigeni extracellulari mediante endocitosi e si attivano in una modalità di presentazione dell'antigene quando i loro precursori, che includono i recettori Toll-like (TLR), i recettori NOD-like (NLR) e vari tipi di C recettori della lectina, riconoscono PAMP come LPS, mannosio terminale e motivi CpG microbici (sequenza dinucleotide citosina-guanosina non metilata affiancata da due 50 purine e due 30 pirimidine). Anche DAMP endogeni come l'acido urico e le heat-shock proteins possono attivare queste cellule. Le DC attivate viaggiano verso il linfonodo drenante dove presentano l'antigene alle cellule T. Durante la migrazione attraverso le vie linfatiche afferenti, overesprimono le molecole MHC di classe II e i ligandi costimolatori CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) specifici per il CD28 espresso dalle cellule T [27]. Tale costimolazione è richiesta, insieme all'antigene, per l'attivazione delle cellule T.

All'interno della DC l'antigene viene trasformato in peptidi corti e quindi espresso sulla superficie cellulare insieme alle molecole MHC di classe II per la presentazione dell'antigene ai linfociti T helper CD4⁺ e ai linfociti T regolatori (Treg). Le DC sono anche in grado di cross-presentare gli

antigeni esogeni trasferendoli nel percorso di elaborazione e presentazione all' MHC di classe I per il riconoscimento da parte dei linfociti T CD8⁺ [28]. Al contrario, gli antigeni citoplasmatici possono subire autofagia ed essere cross-presentati ai linfociti T CD4⁺ dopo presentazione dell' MHC di classe II [29]. Le DC possono anche agire per limitare le risposte immunitarie. Le interazioni dei linfociti T con le DC prive dell'espressione delle molecole costimolatorie CD80 e/o CD86 inducono anergia (inattivazione funzionale) nella cellula T.

Sebbene le cellule B siano in grado di riconoscere l'antigene senza l'intervento di nessun altro tipo di cellula, il riconoscimento è più efficiente se più copie dell'antigene vengono "presentate" alla cellula B sotto forma di immunocomplessi tenuti sulla superficie delle cellule dendritiche follicolari (FDCs) [30]. Si tratta di un tipo di cellula completamente diverso dalle DC: esse infatti non fanno fagocitosi e mancano di molecole MHC di classe II. Inoltre, non sembrano essere derivati dal midollo osseo ma sembrano derivare da cellule reticolari fibroblastiche nelle aree delle cellule B dei tessuti linfoidei. Possono presentare immunocomplessi alle cellule B in modo molto efficiente in virtù dei loro recettori FcγRIIB per i recettori IgG e CR1 e CR2 per il complemento.

Le risposte adattative coinvolgono l'espansione clonale dei linfociti B e T antigene-specifici. I linfociti B si differenziano in plasmacellule che secernono gli anticorpi antigene-specifici responsabili dell'eliminazione delle cellule infettate o sopprimono le risposte immunitarie indesiderate.

Lo sviluppo dei linfociti interessati avviene secondo due distinte modalità: i precursori delle cellule T migrano dal midollo osseo al timo, sede principale per il loro sviluppo e della loro ricombinazione con successiva espressione dei geni per TCR [31].

La crescita di cellule T αβ attiva l'espressione delle molecole di superficie delle cellule CD4 e CD8 e sono quindi indicate come cellule T "doppie positive". Questa doppia espressione consente alle cellule T αβ di interagire potenzialmente con entrambe le molecole MHC di classe I e MHC di classe II. Il CD4 si lega ai residui conservati (non polimorfici) sulla molecola MHC di classe II, mentre il CD8 si lega ai residui conservati su MHC di classe I. [32]. Si verifica quindi la selezione positiva e negativa delle cellule T αβ; in questa fase relativamente iniziale della loro differenziazione, le cellule T αβ sono programmate per subire l'apoptosi e vengono salvate da questa "morte" predefinita solo se il loro TCR è in grado di legarsi al MHC self sulle cellule epiteliali timiche. La selezione positiva garantisce che il TCR αβ generato casualmente sia in grado di interagire con le molecole MHC self (cioè, quelle varianti alleliche dell'MHC che sono presenti nell'individuo). Le cellule T perdono l'espressione di CD4 o CD8 per diventare cellule CD4 o CD8 "singole positive" durante la selezione positiva. La selezione negativa per delezione clonale nel timo costituisce la tolleranza centrale delle

cellule T autoreattive. I peptidi sono generati da un numero di autoantigeni limitati agli organi e ai tessuti espressi ectopicamente nel timo e nei linfonodi periferici sotto il controllo trascrizionale della proteina del regolatore autoimmune (AIRE) [33]. La selezione negativa, come l'incapacità di essere selezionati positivamente, si traduce in un'estesa morte delle cellule T all'interno del timo. Le cellule T che superano con successo questi ostacoli escono dal timo ed entrano nella periferia, un termine usato per indicare qualsiasi posizione al di fuori degli organi linfoidei primari (midollo osseo e timo). Queste cellule T $\alpha\beta$ mature e naive saranno in grado di riconoscere i peptidi estranei presentati dall'MHC. Generalmente, le cellule T $\gamma\delta$, sebbene sorgano anche nel timo, non esprimono né CD4 né CD8 e riconoscono l'antigene direttamente piuttosto che sotto forma di peptide-MHC.

Per quanto riguarda i linfociti B invece è necessario considerare un gruppo di cellule precursori definite come *cellule B1*, che si sviluppano precocemente durante l'ontogenesi e spesso esprimono la molecola di superficie CD5 [34]. Queste cellule secernono anticorpi IgM aventi una affinità variabile e sono in grado di esibire una poliattività, cioè la capacità di saper riconoscere diversi antigeni, inclusi agenti patogeni e autoantigeni comuni. Tali anticorpi sono spesso indicati come anticorpi naturali a causa della loro esistenza in assenza di un evidente stimolo antigenico. Come i linfociti T, anche i B sono collettivamente in grado di produrre un numero enorme di differenti regioni variabili sui loro recettori antigenici. Raggiungono questo obiettivo ricombinando i loci genici delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline in un processo analogo al riarrangiamento dei geni TCR nelle cellule T. All'inizio dello sviluppo delle cellule B, le *cellule pro-B* maturano in *cellule pre-B*, a quel punto esprimono RAG-1 e RAG-2. L'espressione di questo pre-BCR sulla cellula B immatura porta alla segnalazione indipendente dal ligando che guida la differenziazione delle cellule B verso la cellula B naïve matura che coesprime gli anticorpi IgM e IgD convenzionali sulla superficie cellulare [35]. Quando la cellula pre-B subisce la maturazione, i segmenti del gene della catena leggera dell'immunoglobulina V (che numero circa 40 per $V\kappa$ e 30 per $V\lambda$) e J (di cui ce ne sono cinque per ogni isotipo della catena leggera) si riorganizzano per produrre una catena leggera κ o λ . Questa catena leggera sostituisce la catena leggera surrogata per produrre un BCR IgM maturo sulla superficie cellulare. L'espressione di RAG-1 e RAG-2 è ora disattivata. Una volta che le cellule B esprimono un recettore dell'antigene maturo, la loro sopravvivenza e l'ulteriore differenziazione diventano dipendenti dall'antigene. Il BCR in questa fase comprende anche anticorpi IgD della stessa specificità, prodotti dallo splicing alternativo del VDJ riarrangiato ai geni della regione costante $C\mu$ o $C\delta$. Dopo il legame al BCR, l'antigene viene endocitato e quindi processato all'interno di endosomi acidificati per la presentazione da parte dell'MHC di classe II alle cellule T helper CD4 [43]. Oltre a un ruolo di presentazione dell'antigene, le cellule B secernono una varietà di citochine tra cui IL-10, IL-12, IL-13, TNF α , TNF β (linfotossina), fattore di crescita trasformante- β (TGF β) e colonia di

granulociti-macrofagi -fattore stimolante (GM-CSF). A seguito di un incontro con l'antigene in presenza di segnali costimolatori, i linfociti B subiscono cicli di proliferazione e quindi si differenziano in cellule di memoria o in alternativa in plasmacellule che producono alti livelli di anticorpi solubili. Molte plasmacellule hanno vita breve, ma altre sopravvivono per lunghi periodi di tempo, in particolare nel midollo osseo [36].

2.2 Le cellule Th17: caratteristica e funzione

Sebbene si pensasse che le cellule Th1 fossero i principali driver dell'autoimmunità organo-specifica, gli animali privi della citochina Th1 IFN- γ o altre molecole coinvolte nel percorso di differenziazione Th1, inclusi IFN- γ R e STAT-1, non sono resistenti, ma più suscettibili a molteplici malattie autoimmuni tra cui l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), uveite autoimmune sperimentale (EAU) e artrite indotta da collagene (CIA) [37,38,39]. Ancora più sorprendente, i topi carenti per la catena di IL-12 p35 erano anche più suscettibili all'EAE, mentre la perdita dell'altra catena di IL-12, p40, rendeva i topi altamente resistenti all'EAE. Questo enigma è stato risolto quando è stato dimostrato che p40 non solo si accoppia con p35 per formare IL-12, ma può anche accoppiarsi con un'altra catena di citochine p19 per formare una nuova citochina chiamata IL-23 [40]. In uno studio fondamentale, Cua e colleghi hanno dimostrato che la perdita sia di p40 che di p19 (IL-23) proteggeva gli animali dall'EAE, mentre gli animali carenti di IL-12-p35, privi di risposte IL-12 e Th1, rimanevano sensibili all'EAE [41,42]. Questi dati hanno fornito le basi per l'ipotesi che IL-23 piuttosto che IL-12 sia cruciale per lo sviluppo dell'autoimmunità. Successivamente è stato rivelato che IL-23 è coinvolto nella generazione di un unico sottoinsieme di cellule T, chiamate *cellule Th17*, a causa della loro produzione della citochina effettrice *IL-17*. Sebbene si pensasse che la generazione di cellule Th17 fosse guidata da IL-23, le cellule T naïve non esprimono il recettore per IL-23 (IL-23R); piuttosto, la differenziazione di Th17 necessita della presenza delle citochine TGF- β e IL-6 [43,44]. Inoltre, *IL-21 induce anche la differenziazione di Th17, in particolare in assenza di IL-6, e promuove l'auto-amplificazione delle cellule Th17 in un loop feedforward* [45,46,47]. Infine, *IL-1 β può sinergizzare con IL-6 per indurre la differenziazione delle cellule murine Th17* [48] e, insieme a TGF- β , IL-6 e IL-21, è stata dimostrata essere un fattore critico di differenziazione per le cellule umane Th17 [49]. Dopo l'interazione con i rispettivi recettori, sia IL-6 che IL-21 inducono la fosforilazione di STAT3, che è cruciale per una corretta differenziazione di Th17 [50]. I segnali di IL-6 e TGF- β portano infine all'espressione dei fattori di trascrizione specifici per il legame fra le Th17/ ROR γ t e ROR α , che transattivano molti geni tra cui IL-17A e IL-17F, IL-23R e la chemochina Th17-specifica per il recettore CCR6 [51,52]. Inoltre, i fattori di trascrizione IRF4 e BATF mediano

gli effetti di IL-21 sulla differenziazione e autoamplificazione di Th17 e sono necessari per l'induzione di ROR γ t [53,54,55]. Uno studio recente ha dimostrato che BATF e IRF4 si legano in modo cooperativo al DNA e regolano l'accessibilità della cromatina, consentendo il successivo legame di pSTAT3 e ROR γ t e l'avvio del programma trascrizionale specifico per Th17 [56]. Un altro fattore che è coinvolto in alcuni aspetti della differenziazione e regolazione delle cellule Th17 è *c-Maf*, che aumenta sia la produzione di IL-21 nelle cellule Th17, contribuendo così all'amplificazione delle cellule Th17 [57], all'aumento della produzione di IL-10 e all'inibizione della produzione di IL-22, modulando così le funzioni effettrici Th17 [58]. L'identificazione di ROR γ t come fattore di trascrizione specifico di Th17, ha permesso di confermare che altri fattori di trascrizione deputati all'espressione per le Th17 (come per esempio T-bet e GATA-3) sono risultati essere superflui per la differenziazione delle cellule Th17 [59]. Inoltre studi recenti che hanno esaminato le reti trascrizionali indotte durante la differenziazione delle Th17, hanno dimostrato che i moduli trascrizionali antagonisti ne promuovono la differenziazione mentre allo stesso tempo sopprimono lo sviluppo di altri sottoinsiemi di cellule T [60,61].

Le citochine di Th17, IL-17A e IL-17F, possono formare omo/eterodimeri e sono parzialmente ridondanti nelle loro funzioni effettrici. Producono un certo tipo di trascrizione del segnale attraverso un complesso recettoriale composto da IL-17RA e IL-17RC, che è espresso sia sulle cellule ematopoietiche che non.

La segnalazione del recettore IL-17 induce la produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie, tra cui IL-6, IL-1, TNF, CXCL1, CCL20, GCP-2 e IL-8, nonché peptidi antimicrobici e matrici di metalloproteasi. Pertanto, le cellule Th17 promuovono l'infiammazione dei tessuti e il reclutamento dei neutrofili (Bettelli et al., 2008). Le cellule Th17 sono importanti per la difesa dell'ospite contro una varietà di agenti patogeni, in particolare batteri come *Citrobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, nonché miceti come *Candida albicans* [59]. Nell'uomo, il ruolo critico delle Th17 e di IL-17 nella difesa dell'ospite è evidente nella suscettibilità dei pazienti con difetti genetici nei geni IL17RA, IL17F o STAT3 alle infezioni da *C. albicans* e *S. aureus* [62]. A parte la difesa dell'ospite, le cellule Th17 sono state principalmente associate all'infiammazione dei tessuti autoimmuni. Pertanto, livelli elevati di IL-17 sono stati rilevati in diverse malattie autoimmuni tra cui la sclerosi multipla (SM) [63], artrite reumatoide (RA) e psoriasi. In EAE, il trattamento con anticorpi neutralizzanti IL-17 ha indotto dei miglioramenti e animali carenti di IL-17 hanno sviluppato forme di EAE attenuate [64,65]. Inoltre, le terapie mirate alle cellule Th17 o alle citochine effettrici Th17 negli esseri umani hanno dato risultati positivi poiché l'uso di un anticorpo umano anti-p40, migliorava le condizioni cliniche sia nella malattia di Crohn che nella

psoriasi [66] e, gli anti-anticorpi IL-17A si sono dimostrati efficaci nel trattamento di psoriasi, RA e uveite [67]. Questi studi hanno stabilito l'importanza delle cellule Th17 come bersaglio terapeutico in diverse malattie autoimmuni umane.

2.3 Relazione tra cellule Th17 e cellule Treg

L'esposizione di linfociti T naïve al TGF- β porta all'espressione del fattore di trascrizione Foxp3 e alla differenziazione in cellule T regolatorie immunosoppressive (Treg). Tuttavia, in combinazione con la citochina proinfiammatoria IL-6, TGF- β induce la produzione di ROR γ t nonché la differenziazione delle Th17 [68,69]. La base molecolare per la relazione reciproca tra le cellule Treg e Th17 risiede nella capacità di ROR γ t / ROR α e Foxp3 di legarsi fisicamente tra loro e di antagonizzare la funzione reciproca [70,71]. Pertanto, è stato dimostrato che molti fattori hanno effetti opposti sulle cellule Treg e Th17 e modulano le risposte immunitarie spostando l'equilibrio tra le cellule Treg e Th17. Ad esempio, *IL-2 agisce come fattore di crescita per le Treg mentre inibisce la differenziazione delle cellule Th17, mentre IL-21 amplifica le risposte Th17, ma inibisce l'espansione della Treg* [72]. Studi recenti hanno riportato che Hif-1 α , un sensore metabolico di ipossia, migliora la differenziazione di Th17 a livello trascrizionale, attenuando contemporaneamente lo sviluppo di Treg [73,74]. È importante sottolineare che la relazione reciproca tra cellule Th17 e Treg offre interessanti opportunità per interventi terapeutici nell'autoimmunità, poiché le terapie future potrebbero essere in grado di indebolire contemporaneamente Th17 e rafforzare le risposte Treg.

2.4 Ruolo delle Th17 nell'intestino

In condizioni non patologiche, esiste una popolazione di cellule Th17 nell'intestino tenue, il cui compito è quello di proteggere l'organismo dalle infezioni. La differenziazione delle cellule Th17 nell'intestino è innescata da parte di alcuni microrganismi commensali, in particolare da batteri filamentosi segmentati. Tuttavia, se non controllate, le cellule Th17 nell'intestino possono indurre un'infiammazione dei tessuti autoimmuni sia direttamente nell'intestino [75] che in organi periferici. Infatti, studi recenti hanno dimostrato che la differenziazione delle Th17 innescata nell'intestino dai commensali può promuovere l'infiammazione dei tessuti autoimmuni nel SNC durante l'EAE e nelle articolazioni durante RA [76,77]. Questi dati suggeriscono che fattori ambientali, come la dieta, possono influenzare la differenziazione del Th17 nell'intestino sia direttamente, sia modulando la composizione del microbiota e quindi aumentare la suscettibilità nei confronti delle malattie autoimmuni. A sostegno di questa ipotesi, due studi recenti hanno dimostrato che una dieta ricca di

sale aumenta la differenziazione di Th17 nell'intestino ed esacerba lo sviluppo di infiammazione dei tessuti autoimmuni durante l'EAE [78,79]. È importante sottolineare che la forte connessione delle cellule Th17 con l'intestino offre anche interessanti opportunità terapeutiche, poiché potrebbe essere possibile manipolare il fenotipo effettore delle cellule Th17 e ridurre la loro patogenicità per mezzo di terapie adeguate. In effetti, uno studio recente ha suggerito che le cellule Th17 proinfiammatorie possono essere reindirizzate all'intestino e tollerate [80,81]. Un approccio simile potrebbe potenzialmente essere utile nella terapia per le malattie autoimmuni umane.

2.5 Le cellule Tfh

Le risposte anticorpali cellulo-dipendenti si verificano nei centri germinativi (GC) dei follicoli linfoidi e richiedono l'interazione tra le cellule B antigene-specifiche e le cellule Th. Prove recenti suggeriscono che questa interazione sia mediata da un sottoinsieme Th distinto, quello delle cellule T helper follicolari (Tfh). Queste cellule Tfh vengono attivate dall'antigene nella zona delle cellule T dei tessuti linfoidi e quindi migrano specificamente verso la periferia dei follicoli per incontrare le cellule B specifiche dell'antigene che sono migrate in questa posizione [82].

Mentre altri sottoinsiemi T helper producono anche IL-21, *la quantità di IL-21 prodotta dalle cellule Tfh è di gran lunga maggiore rispetto alle cellule Th1 e Th2*. Le risposte immunitarie che guidano la differenziazione di altri sottoinsiemi TH possono anche dare origine a sottotipi distinti di cellule Tfh [82,83]. Ad esempio, è stato dimostrato che le cellule Th1 e Th2 generate in vitro si sviluppano in cellule Tfh dopo il trasferimento adottivo. Coerentemente con l'importante ruolo delle citochine nella regolazione della commutazione dell'isotipo, le cellule Tfh possono secernere IFN- γ , IL-4 e IL-17, sebbene a livelli inferiori rispetto alle cellule Th1, Th2 o Th17 convenzionali. Pertanto, durante le prime fasi dello sviluppo delle cellule Tfh, alcune cellule potrebbero aver sovraregolato CXCR5 ma non ancora attivato Bcl6[84]. Tuttavia, con l'ingresso nel follicolo e con l'interazione con le cellule B, l'espressione di Bcl6 aumenta e l'impegno del legame con le Tfh si stabilizza, commisurato alla sottoregolazione dei geni associati Th1, Th2 e Th17. Pertanto, la capacità di altri sottoinsiemi Th di dare origine a cellule Tfh è probabilmente cruciale per coordinare in modo appropriato le risposte immunitarie umorali e cellulari [84]. Collettivamente, le cellule Tfh sono emerse come un sottoinsieme di T helper distinto che fornisce un aiuto fondamentale alle cellule B e regola le reazioni GC e, di conseguenza, controlla le risposte immunitarie umorali. Numerose malattie autoimmuni sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi autoreattivi. È stato suggerito che i GC possono guidare la generazione patogena di autoanticorpi. In modelli animali per LES, ad esempio, la generazione spontanea di GC è correlata con una maggiore concentrazione sierica di autoanticorpi [85]. È stato

dimostrato che l'aiuto cognitivo delle cellule Tfh promuove la sopravvivenza, l'espansione e la differenziazione delle cellule B autoreattive, che alla fine hanno portato alla produzione di autoanticorpi e promosso danni ai tessuti [86]. Inoltre, è stato dimostrato che la funzione aberrante delle cellule Tfh promuove lo sviluppo di malattie in modelli animali di SLE e RA ed è caratterizzata da espansione GC, aumento di IL-21 e espansione delle cellule Tfh in siti extra-follicolari [86]. Nelle malattie autoimmuni umane, è stato osservato che l'espansione delle cellule Tfh circolanti in pazienti con dermatomiosite giovanile, AR, LES e sindrome di Sjögren è fortemente correlata con l'aumento dei plasmablasti e delle concentrazioni sieriche di anticorpi anti-dsDNA e antinucleari [86,87,88]. Queste osservazioni sono altamente indicative del ruolo che le cellule TFH aberranti possono svolgere nella patogenesi dell'autoimmunità.

CAPITOLO 3

3.1 L' IL-21: struttura e funzione

L'IL-21 e il suo recettore IL-21R sono stati evidenziati per la prima volta negli anni 2000 [45-47, 50, 53-55, 57, 58]. Studi successivi hanno permesso di comprendere meglio le sue azioni dal punto di vista biologico e sui meccanismi molecolari che controllano le risposte cellulari mediate dall'IL-21 stessa: questo ha permesso di approfondire ulteriormente il suo ruolo chiave, dando così avvio ad una serie di trial clinici per diverse patologie.

L'IL-21 è una citochina con ampie azioni pleiotropiche che va ad influenzare una varietà di cellule immunitarie a seconda del tipo e del loro stadio di sviluppo; svolge un ruolo importante nella differenziazione e nella segnalazione di eventi sia del sistema immunitario innato che di quello adattativo e, non solo ha ruoli chiave nelle risposte antitumorali e antivirali, ma esercita anche un'azione sulle risposte infiammatorie che promuovono lo sviluppo di malattie autoimmuni e disturbi infiammatori. Numerosi studi in vivo, hanno dimostrato che il potenziamento o l'inibizione dell'azione da parte dell'IL-21, può avere effetti terapeutici positivi su un'ampia gamma di malattie e per questo sono attualmente in corso vari studi clinici per il potenziamento di nuovi trial.

Dal punto di vista immunologico, l'IL-21 è coinvolta nei meccanismi di differenziazione per i linfociti T, le cellule Natural killer (NK) dove l'attivazione delle stesse da parte dell'IL-21 induce la secrezione di varie citochine pro-infiammatorie e ne va ad aumentare la loro citotossicità naturale contro le cellule tumorali. Questa citochina dunque presenta una funzione di efficace agente antitumorale, infatti secondo alcuni dati piuttosto significativi derivanti da studi preclinici e clinici, è stato stabilito che l'IL-21 possa svolgere un ruolo importante nella terapia antitumorale. L'efficacia di tali agenti antitumorali potrebbe essere potenziati dalla combinazione con anticorpi monoclonali terapeutici.

Allo stesso tempo l'IL-21 agisce su altre popolazioni cellulari: inibisce l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche (DC), promuove gli stadi della differenziazione cellulare dei linfociti B e, per mezzo di meccanismi di induzione porta all'avanzamento dell'apoptosi [89].

L' IL-21 è una citochina composta da una struttura a quattro gruppi α -elicoidali dove un segmento della molecola che implica il dominio C, è coinvolto nel legame con il recettore. Il gene specifico per l'IL-21 è stato identificato a livello della regione 4q26-q27 ed è distante 180 kb dal gene dell'IL-2: a tal proposito è stata trovata una somiglianza a livello della struttura degli esoni e degli introni dei corrispettivi geni dell'IL-21 e dell'IL-2. Vicinanza e somiglianza tenderebbero quindi a suggerire che i due geni potrebbero nascere da un meccanismo di duplicazione [90].

Il recettore di IL-21 (IL-21R) è stato scoperto per mezzo di tecniche di sequenziamento genomico basato su sequenziamento expressed tag (EST) e classificato inizialmente come un nuovo recettore "orfano" di citochina di tipo I. Contiene quattro residui di cisteina conservati, un motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (dove X indica un amminoacido) e un amminoacido sequenza più simile a quella della catena β del recettore IL-26. Il gene che codifica per IL-21R si trova sul cromosoma umano 16, immediatamente a valle del gene che codifica IL-4. La stessa IL-21 è stata identificata mediante clonazione di espressione ed è molto simile a IL-2, IL-4 e IL-15, citochine che, insieme a IL-7 e IL-9, legano i recettori che contengono γ_c come componente recettore cruciale [91,92].

A sostenere questa teoria, l'uso di diverse linee cellulari in sperimentazione ha evidenziato come l'IL-21 e l'IL-4 umane vadano a legarsi ad epitopi di γ_c parzialmente sovrapposti [93]. La formazione di un complesso ternario tra γ_c e IL-21 / IL-21R immobilizzata ha prodotto un'apparente costante di dissociazione di 160 nmol / L, un'affinità di legame 25 volte superiore a quella osservata tra IL-4 e l'ectodominio IL-4R α in condizioni simili. La segnalazione alterata di IL-21R è stata recentemente collegata a deficit di sviluppo e di natura funzionale all'interno di compartimenti linfoidi in pazienti XSCID con deficit di γ_c : una segnalazione difettosa mediata da IL-21 stessa contribuisce ad un non corretto sviluppo degli organi linfoidi e / o alla non corretta trasduzione del segnale da parte dei linfociti stessi: i linfociti B di questi pazienti mostrano profondi difetti nella funzione dei linfociti B, in parte a causa della loro incapacità di passare alla classe di isotipo da IgM a IgG. (Fig.4)

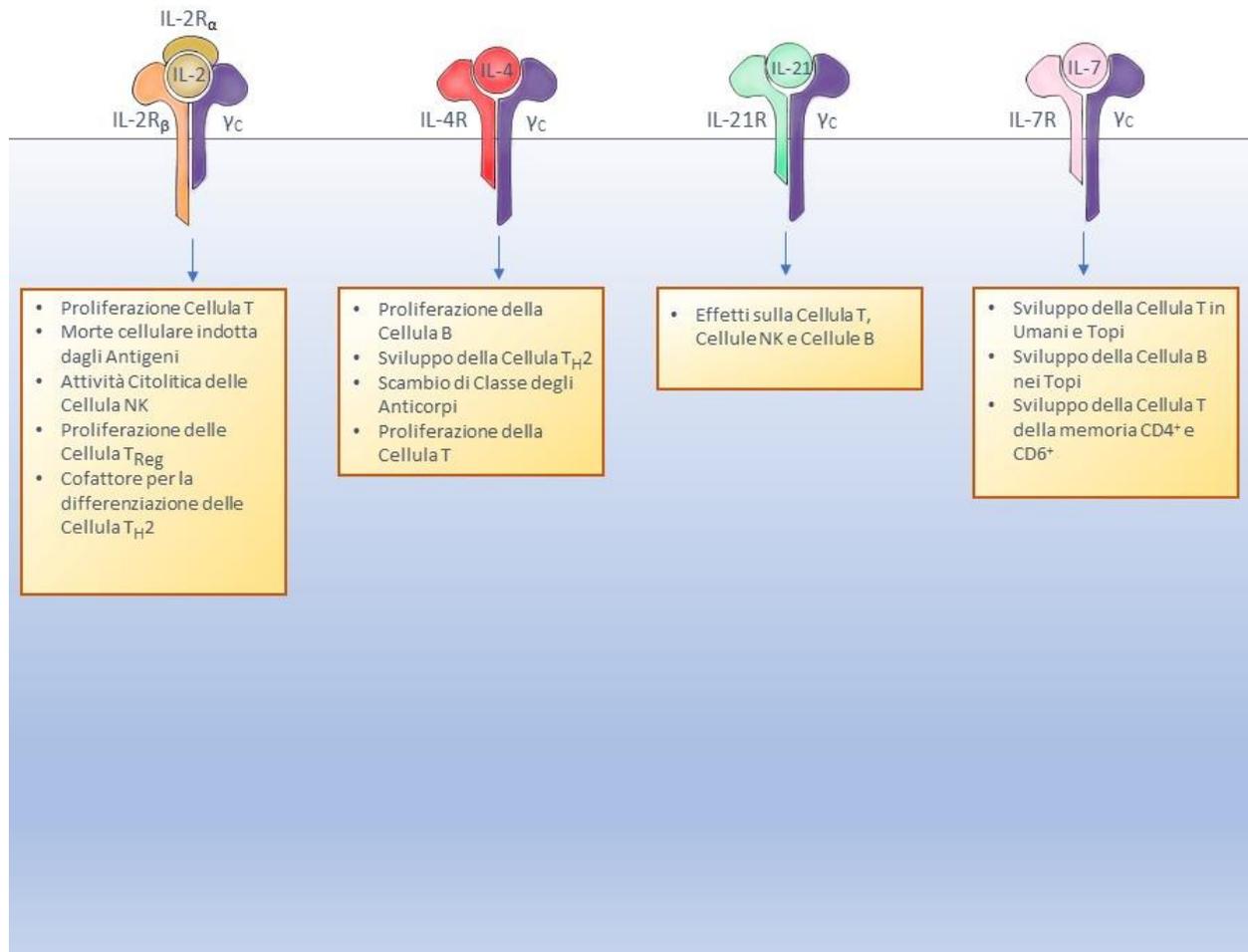


Fig.4: Struttura e funzionalità dell'IL-21 e del suo corrispettivo recettore sull'attività e lo sviluppo delle cellule B e T

IL-21 attiva le tirosin chinasi della proteina della famiglia JAK, JAK1 e JAK3, con JAK1 che va a legarsi IL-21R e JAK3 che lega γ_c [94]. Queste chinasi mediano l'attivazione dipendente da IL-21 della trasduzione del segnale, e svolgono il ruolo di attivatore nella trascrizione di STAT1 e STAT3 e, in misura minore, STAT5A e STAT5B [95,96,97,98]. È interessante notare che allo stesso tempo anche IL-2, IL-7, IL-9 e IL-15 attivano STAT5A e STAT5B [99,100];, mentre IL-4 attiva principalmente STAT6 [101,102]. Ciò rende IL-21 distintiva tra le citochine γ_c -dipendenti in termini di attivazione dominante di STAT1 e STAT3, sebbene l'attivazione di STAT1 e STAT3 non sia esclusiva di IL-21: ad esempio, IL-2 attiva anche queste STAT17. Sia STAT1 che STAT3 possono avere effetti opposti sulle vie apoptotiche, con STAT1 che promuove l'apoptosi [103,104] e STAT3 che promuove l'oncogenesi [105,106].

La rilevanza di questa attivazione selettiva di STAT1 e STAT3 per la regolazione specifica del tipo di cellula e del segnale da parte di IL-21 resta ancora però da determinare. Altre vie di segnalazione utilizzate da IL-21 oltre alla via JAK-STAT non sono ancora ben caratterizzate. (Fig.5)

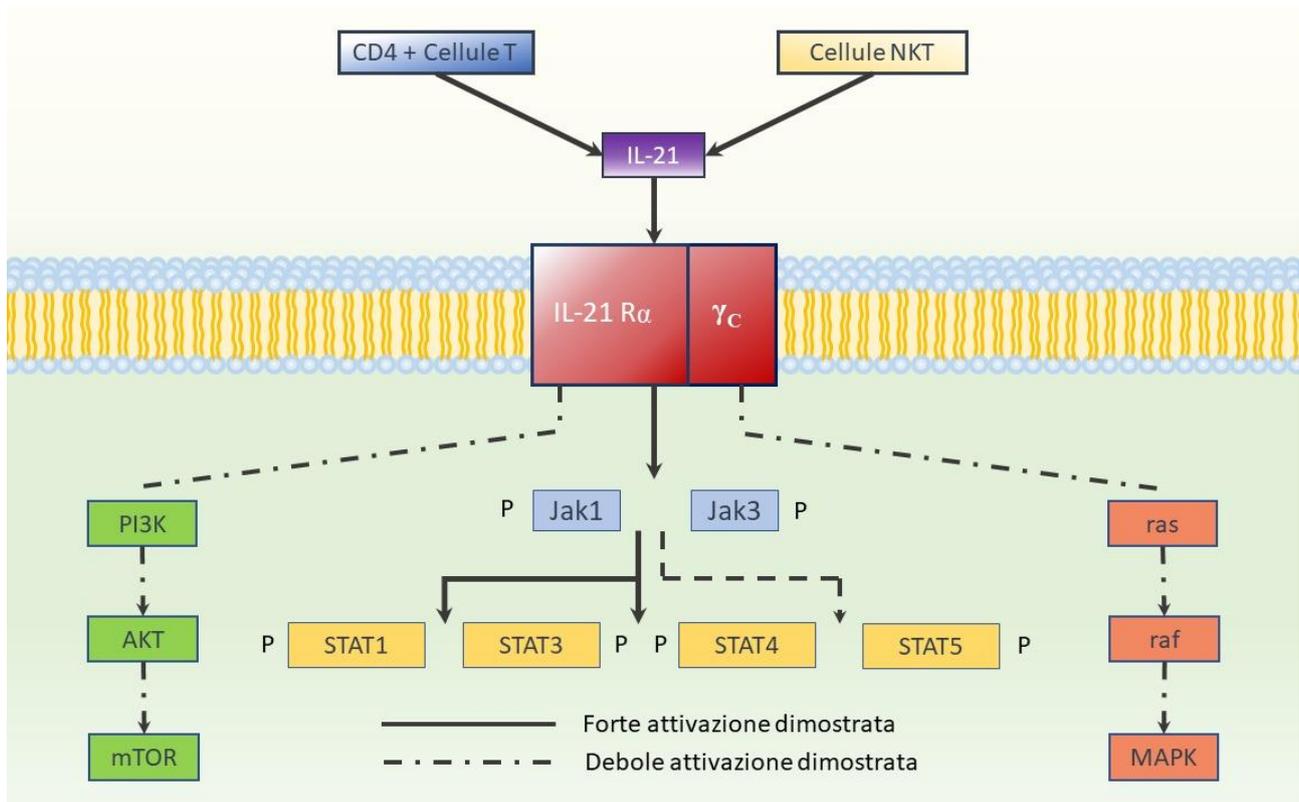


Fig.5: Vie di segnalazione per il recettore IL-21 (IL-21R).

Dopo l'associazione IL-21, Jak1 e Jak3, che interagiscono con IL-21R e γ_c , ne permettono l'attivazione con successivamente l'evolversi della fosforilazione di Stat3 e Stat1 (più debole è invece quella di Stat5). Questo porta alla dimerizzazione di STAT e alla traslocazione nel nucleo, con successivo legame con gli elementi regolatori del gene bersaglio. Una tirosina critica presente nel dominio citoplasmatico per il IL-21R è Y510, principale responsabile dell'aggancio di Stat1 e Stat3. Inoltre, il legame del ligando all'IL-21R può portare all'attivazione della MAP chinasi (MAPK) e delle vie PI 3-chinasi (PI 3-K). I geni bersaglio attivati da IL-21 sono stati identificati, ma il coinvolgimento di ciascuna di queste vie di segnalazione nella regolazione di questi geni resta ancora da chiarire.

IL-21 è prodotta principalmente dalle cellule T CD4⁺. L'IL-21R è espresso preferenzialmente da cellule T, cellule B, cellule NK, alcune popolazioni di cellule mieloidi e cheratinociti [107,108]. Nella via di sviluppo del timo, l'IL-21R è assente a livello delle cellule immature come CD4⁻ e CD8⁻ (doppio negativo), mentre è espresso dai timociti CD4⁺CD8⁺ (doppio positivo) e il suo livello di

espressione aumenta ulteriormente in CD4⁺ e CD8⁺ (singolo positivo) nei timociti. Sebbene questo modello di espressione potrebbe indicare un ruolo per IL-21 nello sviluppo timico, l'IL-21R è espresso anche dalle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ spleniche naive situate sulla superficie delle cellule T di memoria CD8⁺. Inoltre, uno studio, ha indicato che IL-21 influenzi lo sviluppo di sottoinsiemi di cellule della memoria di classe T $\gamma\delta$ [109]. Studi successivi hanno dimostrato che le cellule Tfh, Th17 e le Treg sono le fonti principali per la produzione di questa citochina. È stato inoltre scoperto l'esistenza di una sotto popolazione delle cellule T CD4⁺ che produce l'IL-21: questo piccolo gruppo caratterizzato da PD-1⁺ CXCR5 – esprimente ICOS, CXCL13 e MAF, prende il nome di cellule T Helper periferiche (Tph) e si trovano principalmente all'interno dei siti infiammatori.

L'IL-21 quindi non è altro che il risultato finale derivante dall'attività di queste cellule ma allo stesso tempo è possibile osservare il suo ruolo di citochina nello sviluppo e successivamente nell'andamento delle risposte immunitarie di natura umorale e cellulare, vedi per esempio l'aumento della proliferazione delle cellule linfoidi, la citotossicità dei linfociti T CD8⁺, la funzione delle cellule NK, il cambio di classe delle immunoglobuline e la differenziazione delle cellule B in plasmacelle. Sebbene le cellule Tfh secernino IL-21, lo sviluppo iniziale di queste cellule, è basato dalla stimolazione data dalla citochina stessa [110].

Le cellule Th17 producono e allo stesso tempo sono regolate dall'IL-21: possiamo quindi affermare che questa citochina è autocrina per le cellule Tfh e Th17. Tramite la co-stimolazione con anti-CD3, l'IL-21, promuove l'espansione delle cellule B mature, la funzione di produzione di globuline e co-stimolazione in risposta all'attivazione indotta da CD40 ma allo stesso tempo può cambiare il suo ruolo, diventando così un regolatore indiretto per la generazione, differenziazione, maturazione ed apoptosi delle cellule B attraverso segnali co-stimolatori specifici [111].

L'IL-21 inoltre può sopprimere l'attivazione e la maturazione della funzione presentante l'antigene da parte delle cellule dendritiche (DC), indurre l'apoptosi anche nelle NK e sospendere o ridurre la generazione delle cellule B con anti-IgM e stimolazione per la produzione dell'IL-4.

Tali effetti pleiotropici presenti sia nell'andamento della risposta immunitaria umorale che innata, evidenziano che l'IL-21 svolge un ruolo chiave nella fisiologia delle cellule T e delle cellule B con relativa produzione di anticorpi. Risulta quindi essere un protagonista chiave nel network immunitario e potrebbe essere un futuro target terapeutico per il trattamento di specifiche patologie autoimmuni o un fattore eziologico per le stesse che coinvolgono le cellule B e la produzione di autoanticorpi [112]. Sia nelle linee delle cellule T che in quelle delle cellule B, i livelli di mRNA che codificano per IL-21R sono sovraregolati dal legame dei recettori dell'antigene, nonché dalla segnalazione attraverso i

recettori Toll-like nel caso delle cellule B [107]. L'espressione di IL-21R è regolata anche da alcune citochine quali l'interferone- α (IFN- α) che riduce i livelli di mRNA di IL21R nelle cellule T e nelle cellule NK [113], mentre IL-21 aumenta i livelli di mRNA di IL21R nelle cellule T. Ciò indica che, mentre IL-21 può sovraregolare le risposte a sè stesso da cellule T, cellule presentanti l'antigene che producono IFN- α potrebbero sottoregolare le risposte a IL-21 da parte delle cellule T e NK. A tal proposito sono stati esaminati diversi sottoinsiemi delle cellule T helper per valutare l'espressione di IL-21: quest'ultimi però hanno mostrato risultati parzialmente contrastanti. In primo luogo, l'analisi DNA microarray dell'espressione di IL21 da parte delle cellule TH1 e TH2 del sangue periferico umano ha mostrato mRNA di IL21 solo nelle cellule TH1, mentre l'analisi dell' mRNA di IL21 in una popolazione di cellule T CD4⁺ follicolari, che hanno il compito di sostenere le cellule B, non hanno evidenziato un fenotipo simile a quello delle cellule Th1 o Th2. Studi in vivo su cellule T CD4⁺ polarizzate, hanno dimostrato che l'mRNA di IL-21 era espresso solo dalle cellule TH2.

Sebbene sia necessario approfondire ulteriormente questo campo d'analisi, i dati attuali indicano nell'insieme che l' IL-21 può essere prodotta sia da cellule Th1 che Th2, nonché da cellule T CD4 + follicolari e, che la produzione di IL-21 è influenzata, in parte, dall'ambiente specifico circostante.

La regione regolatrice 5' del gene che codifica per IL-21 è stata parzialmente caratterizzata e, sono stati identificati i siti di legame per il fattore di trascrizione, fattore nucleare delle cellule T attivate (NFAT). Contrariamente all'IL-2, l'espressione di IL-21 può essere indotta nei linfociti T pre-attivati mediante l'aggiunta di solo ionoforo di calcio, mentre l'espressione di IL-2 richiede sia ionoforo di calcio che un segnale della protein chinasi C, indicando in questo modo l'esistenza di requisiti diversi per la manifestazione di quei geni specifici che codificano per citochine γ -dipendenti [114]

3.2 Il ruolo dell'IL-21 nelle cellule T

L'IL-21 sembra essere un fattore chiave per la maturazione delle risposte immunitarie adattative delle cellule T. Prodotta dalle cellule T CD4⁺, in particolare dai sottoinsiemi di cellule Th1, Th2 e Th17, nonché dalle cellule NK. In generale, l'IL-21 può essere descritta come una molecola co-stimolatrice delle cellule T. L'IL-21R è presente sia sui linfociti T CD4⁺ che su quelli CD8⁺ [115]. Il trattamento dei linfociti T CD4⁺ naïve con IL-21 down-regola la produzione di IFN- γ senza influenzare la

produzione di altre citochine Th1 [113]. Stimolazione dei linfociti T CD8⁺ con IFN- α e IL-21 innesca una maggiore attivazione di STAT3. Questa costimolazione permette anche un aumento selettivo di espressione MHC di classe I, NK e delle cellule T CD8⁺ [116].

Sebbene IL-21R sia espressa a livelli equivalenti dalle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ [107], la capacità dell'IL-21 di co-stimolare la proliferazione dei timociti e dei linfociti T periferici attivati con l'anticorpo CD3-specifico [105] è principalmente applicabile alle cellule T CD8⁺, con cellule T CD4⁺ naive che mostrano una scarsa proliferazione [117]. I topi IL21R - / - hanno dimostrato di avere un numero normale di cellule T CD4⁺ sia nel timo che negli organi linfoidi periferici. Tuttavia, un gruppo di ricerca ha scoperto che, durante la polarizzazione verso le cellule Th1, l'aggiunta di IL-21 potrebbe ridurre la produzione di IFN- γ senza influire sulla produzione di altre citochine Th1 (come il fattore di necrosi tumorale, linfotossina- α e IL-2) o espressione del fattore di trascrizione specifico delle cellule Th1, T-bet [128], ma che IL-21 non ha avuto alcun effetto inibitorio comparabile sulle cellule Th1 completamente polarizzate. Al contrario, un altro studio ha mostrato che IL-21 potrebbe indurre l'espressione di diversi geni coinvolti nelle risposte delle cellule Th1, inclusi quelli che codificano IFN- γ , la catena β del recettore IL-12 e T-bet. Quindi, il ruolo dell'IL-21, se presente, nella produzione di citochine Th1 rimane poco chiaro e potrebbe dipendere dal particolare sistema sperimentale.

IL-21 svolge anche un ruolo importante nella regolazione dello sviluppo di Th17: quest'ultime sono moderate dalla sovra-regolazione dell'IL-23R indotta da IL-21 stessa. L'IL-23 è importante nello sviluppo delle cellule Th17, ma il suo recettore non è espresso sui linfociti T naïve [118], pertanto, l'induzione di IL-23R mediata da IL-21 può essere fondamentale per lo sviluppo e la differenziazione delle Th17. IL-21 è anche coinvolto nella regolazione dello sviluppo di un altro sottoinsieme di cellule T note come cellule T regolatorie (Treg). Le Treg sono CD4 + CD25 + sottoinsieme di cellule T che sopprime la risposta immunitaria di altre cellule. L'attivazione del recettore delle cellule T (TCR) stimola la sovra-regolazione dell'IL-21R sulle cellule Treg naïve. (Fig.7)

3.3 IL-21 e la sua interazione con le CD8⁺

L'IL-21 è prodotta dalle cellule T CD4⁺ ma ha un ruolo considerevole nella regolazione della proliferazione e dell'attività delle cellule T CD8⁺ naive e di memoria. La sopravvivenza e l'espansione clonale omeostatica delle cellule T CD8⁺ naive e di memoria sono ben note per essere regolate in modo positivo da segnali mediati da IL-7 e IL-15 [119,120,121]. Recentemente, è stato scoperto che

IL-21 ha un marcato effetto sinergico sulla proliferazione in vitro delle cellule T CD8⁺ quando combinato con IL-7 o IL-15 [117] ma da solo ha avuto scarso effetto. IL-21 e IL-15 inducono sinergicamente la proliferazione di cellule T CD8⁺ naive (CD44^{low}) e di memoria (CD44^{high}), indicando che IL-21 ha un ruolo sia nell'inizio che nel mantenimento della risposta delle cellule T CD8⁺. Questa combinazione di citochine può aumentare il numero di cellule T CD8⁺ che producono IFN- γ , dimostrando così un effetto cooperativo non solo sull'espansione clonale ma anche sulla funzione effettrice. Infatti, l'attività citotossica delle cellule T CD8⁺ attivate dall'antigene in vitro è stata indotta al massimo dalla combinazione di IL-21 e IL-15.

3.4 IL-21 e NK

L'IL-21 ha mostrato effetti di natura sia positiva che negativa sulle cellule Natural Killer (NK): i tipi di risposta che si vengono a manifestare sembrano variare sia per lo stadio di maturazione delle cellule stesse, sia per la concentrazione dei fattori co-stimolanti. I meccanismi di crescita e sviluppo di queste cellule dipendono anche dall'attività svolta dalle γ -citochine dipendenti, è stato infatti dimostrato attraverso studi su specifici modelli murini che, la mancanza o carenza di citochine γ dipendenti, venivano a mancare di produzione di cellule NK allo stadio maturo [122].

Studi in vitro caratterizzanti la possibile correlazione tra IL-21 e cellule NK, hanno mostrato una gamma di risposte che indicano un ruolo potenzialmente importante e complesso da parte di questa citochina nella risposta immunitaria innata.

Va notato che gli effetti riportati dall'IL-21 sulle cellule NK sembrano variare a seconda della specie, dello stato di attivazione o dello stadio di maturazione delle cellule, nonché della relativa concentrazione di IL-21 (e fattori co-stimolatori) utilizzati in ciascuno studio. Ad esempio, i saggi in vitro suggeriscono un ruolo dell'IL-21 nell'espansione di cellule umane mature CD16⁺, CD56⁺⁺, NK da cellule progenitrici ematopoietiche del midollo osseo in sinergia con IL-15 [123]. L'effetto più drammatico in questo sistema di co-cultura è l'influenza di IL-21 sulla maturazione delle cellule NK: essa infatti promuove un notevole aumento della risposta citotossica di questa popolazione rispetto alle cellule CD16⁻, CD56⁺, che si sviluppano solo dopo l'esposizione ad IL-15.

Inoltre, IL-21, come IL-2 o IL-15, può stimolare l'attività citolitica delle cellule NK umane periferiche mature e, in sinergia con IL-15 o IL-18, aumenta la produzione di IFN- γ nelle cellule primarie umane di NK. Contrariamente a questi ruoli co-stimolatori nella fisiologia delle cellule NK umane, Kasaian et al. hanno dimostrato che IL-21 inibisce l'espansione mediata da IL-2 o IL-15 delle cellule NK

murine naïve e migliora la funzione effettrice solo dopo la preattivazione di cellule NK in vivo con poli I: C o in vitro con IL-15. In queste condizioni, la restimolazione con IL-15, IL-21 o la loro combinazione ha aumentato notevolmente la citotossicità delle cellule NK e ha determinato livelli elevati di produzione di IFN- γ con o senza co-stimolazione di IL-12 [124]. È interessante notare che la risposta potenziata dell'effettore a IL-21 o IL15 più IL-21 è stata accompagnata da una forte riduzione della vitalità cellulare, mentre il trattamento con IL-15 da solo ha prolungato la sopravvivenza. Pertanto, in questo contesto, IL-21 promuove l'attivazione funzionale ma non riesce a sostenere la vitalità e antagonizza l'effetto di sopravvivenza dell'IL-15 sulle cellule NK murine attivate. Insieme alla capacità dell'IL-21 di aumentare la funzione delle cellule T antigene-specifiche, Kasaian et al hanno interpretato l'inibizione indotta da IL-21 dell'espansione delle cellule NK a riposo e la sopravvivenza delle cellule NK attivate come un possibile meccanismo per limitare la loro partecipazione continua nella risposta immunitaria dell'ospite quando il sistema adattivo si attiva. Pertanto, come prodotto delle cellule T CD4+ attivate, IL-21 potrebbe servire a facilitare la transizione tra immunità innata e adattativa, migliorando notevolmente i meccanismi effettori delle cellule T e delle cellule NK attivate [122].

3.5 Ruolo di IL-21 nella funzione delle cellule B.

Per quanto riguarda i linfociti B, l'IL-21 ha degli effetti sulla differenziazione e la produzione degli anticorpi. Tali effetti sono dovuti dalla natura del segnale co-stimolatorio coinvolto: fra questi per esempio è importante la natura del legame che si viene a creare con il recettore di superficie CD40 che a sua volta, dal punto di vista fisiologico, è mediato dall'espressione del ligando CD40 espresso sui linfociti T attivati; il tipo di segnalazione che viene a crearsi, avviene per mezzo di specifici recettori implicati nel riconoscimento dei patogeni, i Toll-like receptor (TLR).

Quindi l'IL-21 aumenta la proliferazione delle cellule B per mezzo del suo legame con CD40 ma allo stesso tempo è possibile evidenziare una sua implicazione nell'apoptosi e nell'inibizione della proliferazione guidata dagli agonisti TLR-4 o TLR-9 o dalla stimolazione con il recettore di superficie cellulare anti-IgM. Nei linfociti B a riposo (naïve) e nella leucemia linfocitica cronica a cellule B, la segnalazione di IL-21R è associata a uno spostamento verso segnali pro-apoptotici: tale effetto è mediato sia dalla sotto regolazione dei mediatori anti-apoptotici come Bcl-XL sia dalla sovra-regolazione dei fattori pro-apoptotici tra cui Blim, JunD / proteina attivatrice-1 e Bcl-6; attivazione di caspasi-3 e caspasi-8 e una maggiore scissione di Bid, poli (ADP-ribosio) polimerasi e p27Kip-1. Si è visto in esperimenti in vitro che l'IL-21 promuove la differenziazione delle plasmacellule

attraverso una maggiore espressione di Blimp-1 ma non induce ipermutazione somatica. Presi insieme questi dati, indicano che IL-21 svolge un ruolo fisiologico chiave nel promuovere le risposte immunitarie umorali mediate dalle cellule T e la maturazione delle cellule B in plasmacellule primarie che producono anticorpi. Queste proprietà di IL-21 suggeriscono che potrebbe anche essere un fattore eziologico in molteplici malattie autoimmuni che coinvolgono le cellule B e la produzione di autoanticorpi [125,99] (Fig.6).

3.6 IL-21 inibisce la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche (DC)

Le DC sono cellule mieloidi periferiche che hanno la capacità di riconoscere i componenti microbici attraverso i recettori di superficie, compiono successivamente l'endocitosi dei patogeni stessi e quindi subiscono la maturazione in risposta ad alcuni di questi componenti microbici. Successivamente a questa maturazione, le DC migrano verso gli organi linfoidi, dove svolgono la funzione di cellule presentanti l'antigene per le cellule T.

Il ruolo dell' IL-21 nella modulazione della proliferazione e/o della differenziazione delle cellule mieloidi deriva dall'osservazione in alcuni esperimenti in modelli murini, dove l'iniezione di un plasmide codificante IL-21 in topi WT ha portato ad un aumento del numero di cellule sia CD11b⁺ che Gr1⁺ nella periferia [126]. Sebbene la maggior parte degli effetti di IL-21 su le cellule linfoidi sono di natura stimolatoria, coinvolgendo quindi una maggiore proliferazione o funzione effettrice, a livello delle DC gli effetti sono in gran parte inibitori. Le DC possono essere generate ed espanse in vitro coltivando cellule precursori del midollo osseo con GM-CSF. Quando le cellule DC vengono espanse e trattate con IL-21 o IL-15, vengono a svilupparsi differenze ben evidenti sia a livello fenotipico che funzionale. Sebbene le DC trattate con IL-15 si comportano come cellule mature e presentanti l'antigene, dato osservato sia nei saggi in vitro che in sperimentazioni fatte in vivo, le DC trattate con IL-21 mantengono un fenotipo immaturo caratterizzato da una bassa espressione di MHC di classe II accompagnato da un aumento dell'assorbimento dell'antigene e da un'espressione di basso livello del recettore CC-chemochina 7 (CCR7) [127].

IL-21 può anche esercitare effetti pro-infiammatori sulle risposte immunitarie attraverso l'induzione nei macrofagi del fattore chemiotattico CXCL8 [128]. I neutrofili apparentemente mancano di IL-21R ma possono essere reclutati in siti di infiammazione indirettamente attraverso l'induzione di CXCL8 mediata da IL-21 sui macrofagi stessi: il ruolo critico svolto dall'IL-21 nella differenziazione ed espansione delle cellule Th17, porta alla produzione di citochine della famiglia IL-17 che influenzano il reclutamento e la funzione dei neutrofili [128, 129]. Pertanto, IL-21 può inibire le

risposte immunitarie o esacerbarle, a seconda della popolazione mieloida considerata e del tempo di esposizione della citochina durante l'induzione della risposta immunitaria [125] (Fig.7).

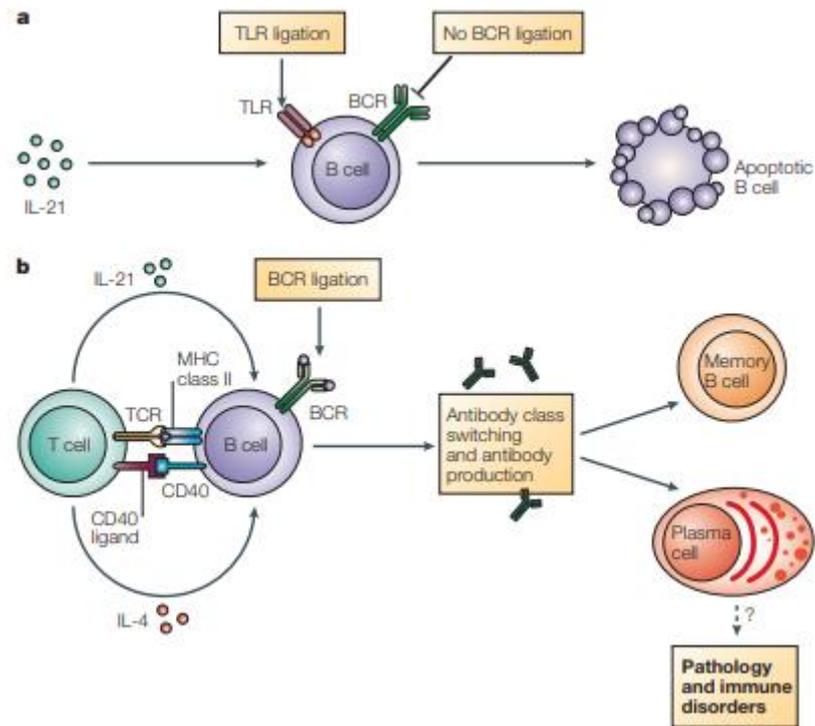


Fig.6: Effetti dell' IL-21 sulla sopravvivenza e la funzione delle cellule B.

L'effetto (i) dell' IL-21 sui linfociti B dipende dalla natura dei segnali co-stimolatori ricevuti. **a** : In assenza di segnalazione attraverso il recettore delle cellule B (BCR) o in presenza della segnalazione attraverso i recettori Toll-like (TLR), IL-21 induce l'apoptosi delle cellule B. **b** : In presenza di segnalazione attraverso il BCR e / o interazioni cellula-cellula con le cellule T che provocano la produzione di citochine come IL-4, IL-21 può indurre la commutazione della classe di anticorpi e la produzione di anticorpi, insieme alla differenziazione delle cellule B verso cellule di memoria post-switch o plasmacellule. Livelli elevati o non regolati di IL-21, presentano un potenziale utile per indurre disturbi di natura autoimmune derivanti dalla sovrapproduzione di anticorpi. [90]

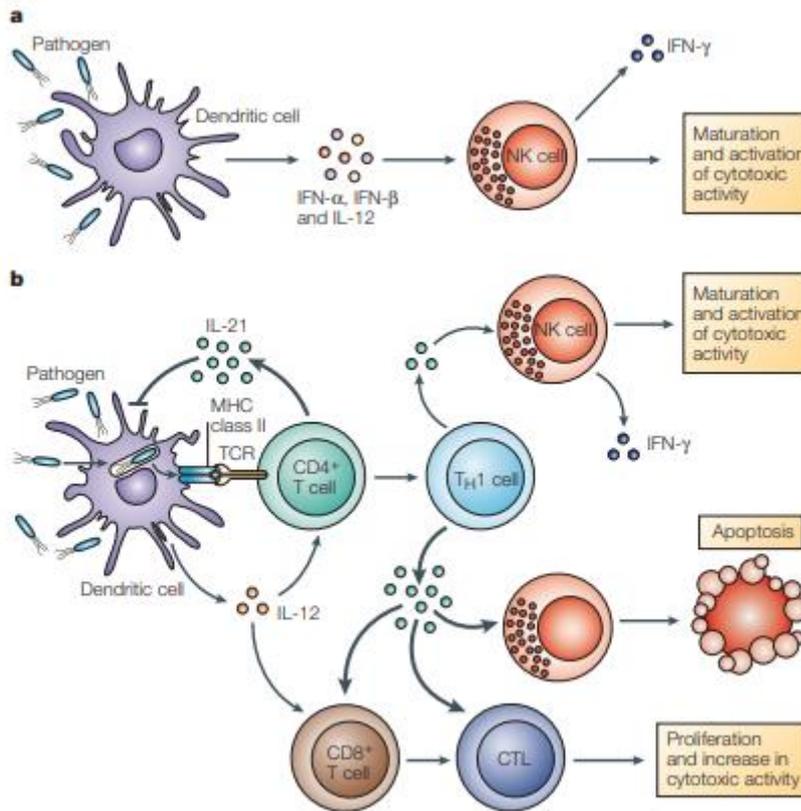


Fig.7: Ruolo temporale dell' IL-21 nella risposta immunitaria ai patogeni.

a: L'incontro precoce di agenti patogeni da parte delle cellule dendritiche (DC) porta alla produzione di interferone- α (IFN- α), IFN- β e interleuchina-12 (IL-12), che a sua volta porta alla maturazione delle natural killer (NK). In assenza di attivazione delle cellule T CD4 + in questi primi punti temporali, i livelli di IL-21 sono bassi o non rilevabili. **b:** Successivamente, durante la risposta allo stesso patogeno, le DC presentano antigeni derivati da patogeni alle cellule T CD4 +, inducendo così la differenziazione di queste cellule T in cellule T helper 1 (TH1) funzionali che producono IL-21. Bassi livelli di IL-21 (frecche sottili) aumentano la maturazione delle cellule NK e l'attività citotossica, ma elevati livelli di IL-21 (frecche spesse) potrebbero indurre l'apoptosi delle cellule NK, nonché sottoregolare la maturazione delle DC24, consentendo al contempo risposte adattative da parte delle cellule T CD4 + e CD8 +. CTL, linfociti T citotossici. [90]

3.7 IL-21 ed Autoimmunità

È evidente che IL-21 controlla una gamma complessa di processi immunitari sia positivi che negativi, i cui effetti regolatori si ripercuotono su cellule bersaglio di natura linfoide e mieloide. Diversi dati in letteratura, sostengono l'ipotesi che l'interruzione o l'amplificazione della trasduzione del segnale mediato da IL-21, potrebbe portare ad effetti vantaggiosi dal punto di vista clinico.

Irregolarità a livello delle cellule T helper, plasmacellule ed espressione dei livelli di autoanticorpi, sono osservabili nelle malattie autoimmuni, nelle quali svolgono per la maggiore un ruolo dannoso.

IL-21, che agisce sia su cellule di natura linfoide che non, è uno dei principali regolatori delle risposte immunitarie umorali: è responsabile delle alterazioni delle cellule T helper come le cellule T_{fh}, Th17 e Treg e dei sottoinsiemi delle cellule B, tra cui le cellule della memoria, le naive e quelle secernenti anticorpi, la cui patogenesi è stata descritta anche nella maggior parte delle malattie autoimmuni ed collegata all'alta espressione di IL-21 o IL-21R. Rispetto ai controlli normali, sono stati trovati livelli elevati di mRNA o proteine di IL-21 nel siero, nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e nei tessuti alterati di pazienti con malattie autoimmuni e correlati con l'inizio e lo sviluppo della malattia. Queste malattie includono lupus eritematoso sistemico (LES), artrite reumatoide (RA), trombocitopenia immunitaria (ITP), diabete di tipo 1 (T1D), sindrome di Sjogren primaria (pSS), malattia tiroidea autoimmune (AITD), psoriasi [10] e altri. In questo caso, le manipolazioni per neutralizzare o diminuire la segnalazione di IL-21 possono portare a una nuova direzione pratica per il trattamento e migliori risultati clinici [125].

Analizzando due modelli murini (Mouse BXSB.B6-Yaa / J, che è un modello di SLE54, e il topo diabetico non obeso (NOD), che è un modello di diabete autoimmune) deputati per lo studio di patologie autoimmuni, in cui è stata incrementata l'espressione dell'IL-21, si è potuto notare che un locus genetico associato al fenotipo autoimmune nei topi NOD, è il locus di suscettibilità al diabete insulino-dipendente 3 (Idd3), contenente i geni di codifica sia per l'IL-21 che per l'IL-2 [131]

I topi NOD presentavano un aumento dei livelli di IL-21 e, questo suggerisce una promozione della proliferazione omeostatica di una popolazione di cellule T CD8 autoreattive. Il ruolo dell'IL-21 nella biologia delle cellule B non è stato discusso dagli autori di questo studio, ma possiamo considerare l'ipotesi che il numero di cellule B notevolmente ridotto nei topi NOD, è dovuto per l'effetto apoptotico dettato dagli alti livelli di IL-21 in assenza di segnali co-stimolatori. Nei topi BXSB.B6-Yaa / J, IL-21 potrebbe essere quindi un fattore iniziale o un fattore accessorio nell'accumulo di plasmacellule e dell'alta produzione degli autoanticorpi [133]. In entrambi i modelli NOD e

BXSB.B6-Yaa / J, resta ancora da determinare se il fenotipo della malattia possa svilupparsi in assenza di segnalazione mediata da IL-21. In un altro modello murino di autoimmunità, EAE, che è un modello di sclerosi multipla, il trattamento dei topi con IL-21 prima dell'induzione della malattia ha notevolmente esacerbato lo sviluppo della malattia mediato dalle cellule NK e la risposta infiammatoria nel sistema nervoso centrale [132,133,134] con effetti sulle risposte delle cellule B e T. Inoltre, i livelli circolanti di anticorpi specifici per la mielina erano nettamente superiori a quelli dei topi non trattati e, le cellule T attivate da IL-21, producevano più IFN- γ in risposta all'antigene iniziale ed erano più propensi a indurre encefalite nei topi naïve. È interessante notare che la somministrazione di IL-21 dopo l'induzione di EAE non ha influenzato la gravità della malattia e non ha indotto livelli più elevati di produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T, indicando ancora una volta che gli effetti di IL-21 sono specifici per lo stadio di la risposta immunitaria, così come l'ambiente delle citochine.

La capacità dell'IL-21 di influenzare la sopravvivenza e la differenziazione sia dei linfociti T che dei linfociti B la rende un bersaglio attraente per l'intervento terapeutico in un'ampia gamma di malattie infiammatorie.

IL-21 è una citochina pleiotropica prodotta in diversi stadi e siti immunologici dettati da una specifica risposta immunitaria. I requisiti per la produzione di IL-21 e la generazione di cellule Th che la producono, sono malattie e tessuti specifici.

Durante uno specifico programma, le cellule T produttrici di IL-21, possono esprimere schemi di marcatori, citochine e fattori di trascrizione funzionalmente specifici per una particolare risposta, e contemporaneamente esprimere molecole che sono antagoniste ad altri programmi, conservando la capacità di prendere spunti dal cambiamento fattori microambientali nel corso di una risposta immunitaria [134].

CAPITOLO 4

4.1 IL-21 e celiachia: la loro correlazione

La celiachia (CD) è una patologia gastrointestinale autoimmune innescata dall'ingestione del glutine, una proteina presente in alimenti come il grano, orzo, segale ed avena, in quegli individui geneticamente predisposti.

Gli alleli HLA-DQA1, DQB1 che codificano per le molecole dell' eterodimero DQ2 e DQ8, rispettivamente, sono i principali marcatori noti per la corretta diagnosi della CD. Questi alleli sono presenti in più del 95% dei pazienti con CD attiva; tuttavia, spiegano solo circa il 40% della suscettibilità genetica: pertanto è possibile quindi evidenziare la complessità dal punto di vista genetico di questa malattia, dato che pare coinvolgere diverse regioni cromosomiche. Alcuni di questi geni come CELIAC2 e CELIAC4, sono risultati essere coinvolti anche nello sviluppo di malattie intestinali di natura infiammatoria (IBD), suggerendo almeno in parte una suscettibilità alla malattia comune. Di conseguenza, più loci, contenenti geni comuni, sembrano essere coinvolti nella suscettibilità alla CD. Sebbene l'analisi genetica abbia scoperto molti marcatori, alcuni con funzione biologica sconosciuta e altri legati alla risposta immunitaria, il contributo individuale di ciascuno è estremamente basso [135].

Il glutine è formato da gliadine e glutenine ad alto contenuto di prolina e glutammina. Queste proteine sono anche chiamate prolamine. Le gliadine e le glutenine sono i componenti principali della frazione di immagazzinamento del grano e sono state ampiamente utilizzate per comprendere i meccanismi della malattia.

A causa del loro alto contenuto di glutammina e dei pattern di sequenza specifici, le prolamine sono eccellenti substrati per la deamidazione da parte della transglutaminasi tissutale. Sia i peptidi deamidati di glutammina che quelli non ammidati vengono presentati ai linfociti T nel contesto delle molecole HLA-DQ2 o -DQ8 dalle cellule presentanti l'antigene nella lamina propria intestinale. Alcuni dei peptidi deamidati hanno un'alta affinità per le molecole DQ2 e DQ8 e hanno una capacità stimolante più forte [136]. Negli individui suscettibili, la risposta adattativa, mediata dall'attivazione dei linfociti T antigeni specifici, guida una risposta proinfiammatoria, caratterizzata principalmente dalla produzione di interferone IFN- γ , che termina in un'enteropatia immuno-mediata, dove gli effetti "collaterali" tipici sono l'atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e aumento l'infiltrazione da parte dei linfociti intraepiteliali. Il tipo di trattamento che viene attuato in quei soggetti predisposti, è quindi

una dieta rigorosa e priva di glutine per tutta la vita, che si traduce in una completa remissione dei sintomi e nel recupero della normale istologia della mucosa [137].

La risposta adattativa convenzionale guidata dal glutine non spiega altri eventi comuni osservati nella mucosa intestinale danneggiata, come la permeabilità epiteliale alterata, causata dalla rottura delle giunzioni strette da parte dei peptidi della gliadina come p31-49 α -gliadina [138]. Questi cambiamenti sono ora riconosciuti come conseguenza dell'attivazione dell'immunità innata mentre l'attivazione di una risposta adattativa con relativa correlazione con alcuni meccanismi innati, risultano essere ancora poco chiari sul come possano influenzare la patogenesi della CD.

In questo scenario, i "peptidi tossici" derivanti dal glutine, innescano una risposta immunitaria innata [139] caratterizzata dalla produzione di IL-15 da parte delle cellule epiteliali e delle cellule dendritiche della lamina propria [140] IL-15 colpisce la barriera epiteliale aumentandone così la sua permeabilità, attraverso l'interruzione delle giunzioni strette [150,151] e inducendo l'apoptosi degli enterociti dopo la riprogrammazione dei linfociti intraepiteliali in cellule natural killer (NK) [152,153]. Pertanto, i peptidi immuno-adattivi, possono ora raggiungere la lamina propria ed essere catturati dalle cellule presentanti l'antigene (DC), per poi essere esposti ai linfociti T specifici del glutine [154,155]. Come accennato, le conseguenze dell'interazione del glutine con la mucosa intestinale in CD sono ben stabilite, mentre i pathway e le classi cellulari coinvolte sono ad oggi ancora da ben definire: vi è una crescente evidenza di un effetto tossico diretto delle gliadine, il componente più studiato del glutine, in diversi modelli biologici [156].

Negli ultimi tempi la definizione clinica di celiachia è cambiata in quanto dall'immagine classica legata essenzialmente al malassorbimento e al danneggiamento della mucosa intestinale, si è passati a sintomi lievi o assenti associati a moderato danno mucoso. In questo contesto, il termine "potenziale CD" è stato assegnato ad individui con DQ2 o DQ8 appropriati, produzione di anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) e mucosa normale dell'intestino tenue, classificati come Marsh 0 (T0, nessun danno) o Marsh 1 stadio (T1, solo infiltrazione intraepiteliale aspecifica) [157, 158]. Questi sono anche definiti "casi positivi sierologici".

Un altro particolare da tenere presente nell'andamento di questa patologia è il ruolo dei linfociti T, che sembrano attivarsi e differenziarsi verso un pattern Th1, come suggerito dagli alti livelli di interleuchina 2 (IL -2), interferone gamma (IFN - γ) e dalla trascrizione fattore T-bet; pare dunque che la celiachia venga mediata da una risposta Th1 predominante ma, non è ancora del tutto chiaro come le cellule Th1 siano indotte e mantenute nell'intestino dei pazienti con CD [157].

Le prove sperimentali indicano che un'interazione attiva e dinamica tra cellule immunitarie e non, abbiano un ruolo cruciale nell'avvio e nella formazione di questo processo patologico e che le citochine siano mediatori essenziali in questo dialogo incrociato. L' IL-21, un membro della famiglia dei recettori a catena γ comune, esercita effetti su più classi cellulari ed è stata recentemente proposta come molecola chiave in questo processo. L'espressione di quest'ultima risulta essere aumentata all'interno della mucosa intestinale sia di pazienti pediatrici che di soggetti adulti con CD attiva, rispetto ai pazienti CD che seguono una dieta priva di glutine e ai pazienti sani di controllo. Pochi studi hanno esaminato l'IL-21 in potenziali CD, suggerendo che l'espressione dell'mRNA è notevolmente ridotta rispetto a CD attivi e pazienti di controllo. È stato dimostrato che IL-15, una potente citochina pro-infiammatoria sovraregolata nella mucosa intestinale di CD, regola la produzione di IL-21. È interessante notare che, nella potenziale mucosa duodenale CD, IL-15 è meno espressa rispetto alla CD attiva. Anche la famiglia delle citochine IL-17 ha un ruolo importante nel dialogo incrociato tra immunità adattativa e innata. È stato dimostrato che le cellule Th 17 producono IL-21 e questa citochina sostiene o promuove la differenziazione delle cellule Th 17 e controlla positivamente l'espressione di IL17A. IL-17, prodotta dalle cellule Th 17, partecipa alla patogenesi di diverse malattie autoimmuni. È stato dimostrato che è aumentato nel CD attivo, sebbene van Leeuwen et al. non lo abbia confermato. Allo stesso tempo, IL-17 non sembra essere espressa in potenziale CD [158, 159].

Data questa varietà di effetti, non sorprende che IL-21 possa svolgere un ruolo chiave nell'inizio, modulazione e progressione di reazioni infiammatorie implicate in diverse malattie immuno-mediate, come le malattie autoimmuni. La sovraespressione di IL-21 nelle cellule beta pancreatiche determina la produzione di citochine infiammatorie (come IL-17A, IL-17F e IFN- γ) e chemochine, oltre a contrastare l'effetto soppressivo delle cellule Treg portando allo sviluppo del diabete di tipo 1. In CD, il locus IL-21 (sul cromosoma 4q27) è stato collegato a un aumento del rischio di malattia e il livello sierico di IL-21 sembra essere aumentato in CD rispetto a popolazione di controllo sana. Inoltre, l'espressione dell'mRNA di IL-21 nella mucosa duodenale era correlata allo stadio di CD, essendo espressa a un livello molto basso in pazienti asintomatici, o all'inizio della storia patologica, e sovraregolata in patologia conclamata. È interessante notare che la densità delle cellule produttrici di IL-21 è risultata aumentata nella lamina propria, dopo stimolazione in vitro con digest peptico-triptico della gliadina. Pertanto, le cellule T CD4 + IL-21 + specifiche del glutine sono presenti e inclini a rispondere a stimoli adeguati. Possiamo supporre che, nella fase iniziale della celiachia, i linfociti T CD4 + reattivi al glutine siano inibiti da meccanismi regolatori efficaci, mentre durante la progressione della malattia in presenza di stimoli specifici queste cellule diventano capaci di sintetizzare IL-21 . Questo fenomeno potrebbe provocare un'amplificazione dell'infiammazione

mucosa in corso, contribuendo all'atrofia dei villi duodenali. Pertanto, sarà quindi necessario predisporre degli studi sulla valutazione dell'espressione di IL-21 in merito ai diversi stadi che caratterizzano l'atrofia dei villi.

Altri dati precedenti mostrano che IL-15, una potente citochina proinfiammatoria sovraregolata nella mucosa intestinale di CD, è necessaria per la regolazione di IL-21. Infine, è stato dimostrato che i livelli sierici di IL-21 sono più alti nei CD rispetto ai controlli. Tutte queste informazioni suggeriscono che in potenziale CD ci sono già segni che suggeriscono l'inclinazione Th1. Si può ipotizzare che manchino i segnali necessari per sostenere e mantenere adeguatamente l'amplificazione della risposta Th1.

Lo scopo della mia ricerca è stato quello di analizzare alcuni campioni di pazienti affetti da celiachia per individuare la presenza di IL-21 a livello sierico e la sua possibile correlazione con il danno della mucosa duodenale [157].

MATERIALE E METODI

Reclutamento pazienti

La raccolta del materiale di studio, campioni di sangue di 160 pazienti affetti da celiachia (come riportato nella Tabella A), è avvenuta previo il consenso informato scritto. La ricerca è stata approvata dal Comitato Etico della Scuola di Medicina, Università degli studi di Napoli "Federico II", Italia, ed era conforme ai principi della dichiarazione di Helsinki II. Il suddetto studio infatti è stato possibile grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Medicina traslazionale e il Laboratorio Europeo per le malattie indotte dagli alimenti (ELFID).

La diagnosi è stata basata secondo i criteri ESPGHAN insieme ai parametri di classificazione Marsh modificata (T0, normale infiltrazione linfocitaria e atrofia dei villi; T1, oltre il 30% di aumento dei linfociti intraepiteliali, enterite linfocitaria; T2, T1 con iperplasia della cripta; T3a, T2 con atrofia dei villi parziali; T3b, T2 con atrofia dei villi subtotali; T3c, T2 con atrofia dei villi totali) [160] (Tabella B). Le IgA anti-tessuto transglutaminasi (IgA anti-tTG) sono state analizzate con l'ausilio dell'ELISA test (Eurospital Diagnostics, Trieste, Italia), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, un metodo di analisi immunologica usato in biochimica per la rivelazione e il dosaggio di antigeni o anticorpi, come precedentemente descritto [161].

Centoventi pazienti erano stati classificati come soggetti in fase attiva di CD (fascia di età 0,8-71): 50 di loro erano adulti (ovvero > 18 anni) e la grande maggioranza (40/50) è risultata essere poco sintomatica, in quanto presentava anemia o ridotta densità minerale ossea. Quaranta pazienti invece erano in remissione con dieta priva di glutine (fascia di età 16-48 anni). Da venti pazienti sono stati raccolti campioni di siero, prelevati secondo diversi intervalli di tempo (scala temporale) ovvero prima e 12 mesi dopo la dieta priva di glutine. La remissione della malattia è stata documentata per mezzo dell'analisi degli autoanticorpi: al momento della loro scomparsa il paziente non presentava più le caratteristiche di CD. I gruppi di controllo erano composti da 45 donatori di sangue di volontari sani (fascia di età 19-45 anni). I sieri sono stati conservati a -80 C° e sono stati scongelati soltanto al momento della sperimentazione.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Sono stati utilizzati kit ELISA specifici per misurare i livelli sierici di IL-21 (eBiosciences, Milano, Italia), secondo il protocollo del produttore. Ogni campione è stato diluito 1:10 e testato in triplicato. La deviazione tra i triplicati era <10% per qualsiasi valore riportato. La soglia di sensibilità più bassa era 0,1 ng/ml.

La risposta analitica era lineare approssimativamente tra 0,162 e 1,200 dei valori di assorbanza (corrispondenti a 0,1 - 50 pg/ml) come valutato dal test di diluizione seriale usando un siero fortemente positivo (dati non mostrati). Per campioni con concentrazione di sIL-21 superiore a 100 ng / ml, i test ELISA sono stati ripetuti utilizzando un fattore di diluizione maggiore (1: 100).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test U di Mann-Whitney per il confronto dei livelli di IL-21. Il test Wilcoxon è stato condotto per analizzare le differenze nella produzione di IL-21 prima e dopo una dieta priva di glutine. L'analisi di correlazione di Spearman è stata utilizzata per valutare la relazione tra IL-21 e livelli di IgA anti-tTG o classificazioni istologiche. Un valore p inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA)

Tabella A. Caratteristiche demografiche del Gruppo di studio

	Età (anni)	Danno della mucosa (n° secondo la scala di Marsh)	Autoanticorpi anti-tTG IgA (ng/ml)
Donatori di sangue sani (n=45)	19-45 30 F, 15 M	non applicabile	non rilevabile
CD totali (n=160)	1-71 105 F, 55 M	T0, n=33 T1, n=7 T2, n=16 T3, n=104	6.9 ± 2.2
Non trattati (n=120)	1-71 84 F, 36 M	T2, n=16 T3, n=104	9,1 - 26
Trattati (n=40)	18-48 21 F, 19 M	T0, n=33 T1, n=7	0.1-8.5

Non trattati: pazienti CD con diagnosi confermata.

Trattati: pazienti CD seguiti con una dieta priva di glutine

Tabella B. Classificazione modificata della scala di Marsh di campioni istologici trovati in pazienti celiaci.

Marsh Type	IEL/100 enterociti-Digiuno	IEL/100 enterociti-duodeno	Iperplasia delle cripte	Villi
0	<40	<30	Normale	Normale
1	>40	>30	Normale	Normale
2	>40	>30	Aumentato	Normale
3a	>40	>30	Aumentato	Blanda atrofia
3b	>40	>30	Aumentato	Marcata atrofia
3c	>40	>30	Aumentato	Completa atrofia

- IEL/100 enterociti, linfociti intraepiteliali per 100 enterociti.
- Tipo 0: Normale; potenziale CD; CD altamente improbabile.
- Tipo 1: Visto in pazienti che seguono una dieta priva di glutine (suggerendo che si stanno ingerendo quantità minime di glutine o gliadina); potenziale CD; pazienti con dermatite erpetiforme; i familiari di pazienti con CD, non specifici, possono essere visti nelle infezioni.
- Tipo 2: Molto raro, visto occasionalmente nella dermatite erpetiforme.
- Tipo 3: Spettro dei cambiamenti osservati nel CD sintomatico.

RISULTATI

Lo scopo del nostro studio è stato quello di verificare la presenza di IL-21 nei sieri di pazienti con CD utilizzando uno specifico test ELISA e, i risultati ottenuti sono stati confrontati con un gruppo di donatori sani. I livelli di IL-21 risultavano essere notevolmente aumentati nella maggior parte dei pazienti con CD (intervallo 16,0-2000,0 pg/ml, media 192,7 pg/ml; mediana 89,7 pg/ml e media geometrica 99,08 pg/ml, IC al 95%), che risultava essere significativamente più alta ($p < 0,001$) rispetto ai controlli (intervallo 16,0-42,2 pg/ml, media 21,0 pg/ml; mediana 16,0 pg/ml e media geometrica 20,3 pg/ml, IC al 95%). Non è stata trovata alcuna correlazione tra i livelli di IL-21 e l'età o la presenza dei sintomi (dati non mostrati).

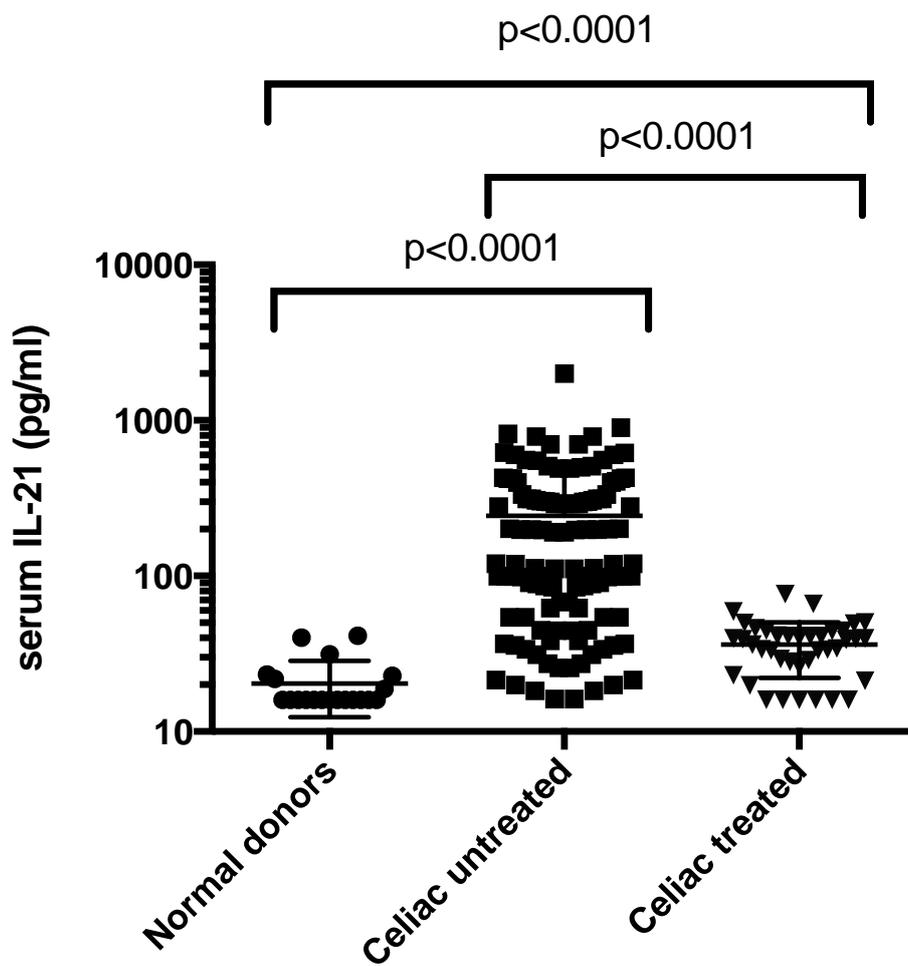
Successivamente, abbiamo analizzato i pazienti con malattia attiva (CD-trattati, $n = 120$) e gli autoanticorpi IgA anti-tTG positivi (> 9 ng/ml), soggetti in remissione con dieta priva di glutine (trattati con CD, $n = 40$) e gli autoanticorpi tTG negativi (< 9 ng/ml). I dati ottenuti, valutando le concentrazioni sieriche di IL-21 nei due sottogruppi, hanno dimostrato una diversa capacità di produzione di IL-21. Come mostrato in Fig. 1A, i livelli sierici di IL-21 sono significativamente più alti nei pazienti con CD non trattati rispetto a quelli in remissione (range 16,2-2000,0 pg/ml e 16,0-76,3 pg/ml rispettivamente, $p < 0,0001$). È interessante notare che i sieri raccolti dagli stessi pazienti prima e 12 mesi dopo l'inizio della dieta priva di glutine hanno mostrato una chiara riduzione della quantità di IL-21: vale a dire, i pazienti che hanno mostrato alti livelli di IL-21 alla diagnosi (intervallo 16,2-428,1 pg/ml, media 179,1 pg/ml; mediana 155,3 pg/ml e media geometrica 115,6 pg/ml, IC 95%) hanno mostrato livelli quasi inosservabili della stessa citochina dopo una dieta priva di glutine (intervallo 16,0-59,2 pg/ml, media 26,2 pg/ml; mediana 26,3 pg/ml e media geometrica 24,6 pg/ml, IC al 95%), $p < 0,001$. Pertanto, nei pazienti con CD che seguono una dieta priva di glutine, le quantità sieriche di IL-21 avevano raggiunto gli stessi valori che sono stati evidenziati nei controlli sani ($p = 0,075$). Di interesse, nessuna diagnosi è stata osservata in cinque pazienti con CD con bassi livelli di IL-21 alla diagnosi (Fig. 1B).

Inoltre, è stata osservata una correlazione positiva statisticamente significativa nei pazienti con CD tra i livelli sierici di IL-21 e gli autoanticorpi tTG (Spearman $r = 0,211$, $p = 0,0001$) (Fig. 2A). La correlazione risultava essere significativa anche quando erano considerati solo i pazienti con CD attivo (Spearman $r = 0,475$, $p < 0,0001$) (Fig. 2B).

Di particolare interesse è stata anche l'evidenza di una correlazione positiva e fortemente significativa dal punto di vista istologico, in particolare sono stati valutati e confrontati i livelli sierici di IL-21 con la classificazione istologica analizzata secondo la classificazione modificata di Marsh (Spearman $r =$

0,877, $p < 0,0001$) (Fig. 3). Pertanto, sembra che la produzione di IL-21 rifletta il danno della mucosa a livello locale.

È possibile quindi concludere affermando che l'IL-21 è presente nei sieri di pazienti con CD e il suo livello è correlato alla presenza di autoanticorpi, al danno istologico e alla presenza di glutine.



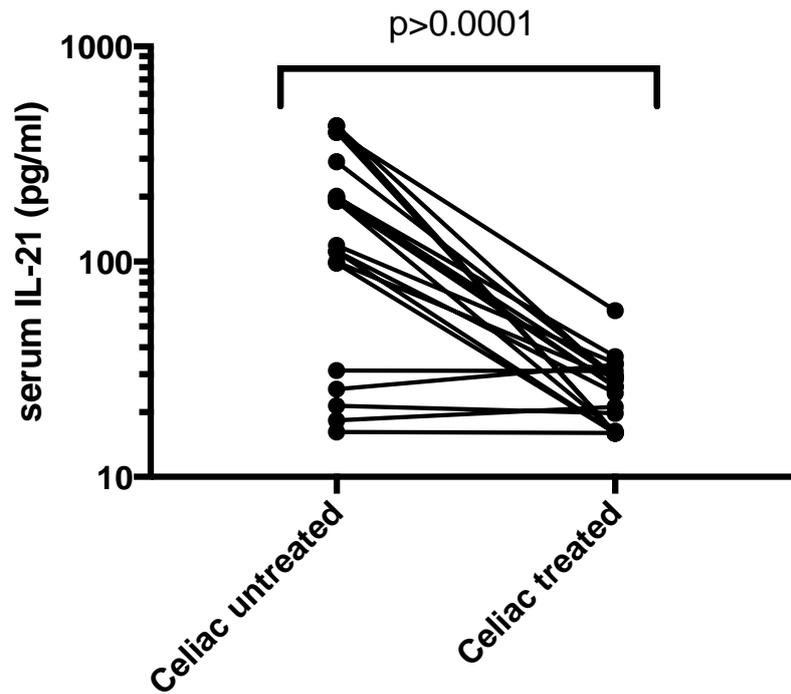


Figura 1. Correlazione tra i livelli sierici di IL-21 e pazienti CD trattati con una dieta priva di glutine

A. I pazienti con CD sono stati suddivisi in due gruppi: non trattati, con diagnosi confermata e trattati, con dieta priva di glutine. I pazienti con CD trattati mostrano una riduzione della produzione di IL-21.

B. Sieri raccolti dallo stesso Gruppo di pazienti (n = 20) a distanza di un anno dalla dieta priva di glutine ha mostrato una forte riduzione dei livelli sierici di IL-21 (p < 0,0001).

I risultati sono espressi in pg/ml. Ogni campione è stato diluito 1:10 e testato in triplicato. La deviazione tra i triplicati era < 10% per qualsiasi valore riportato

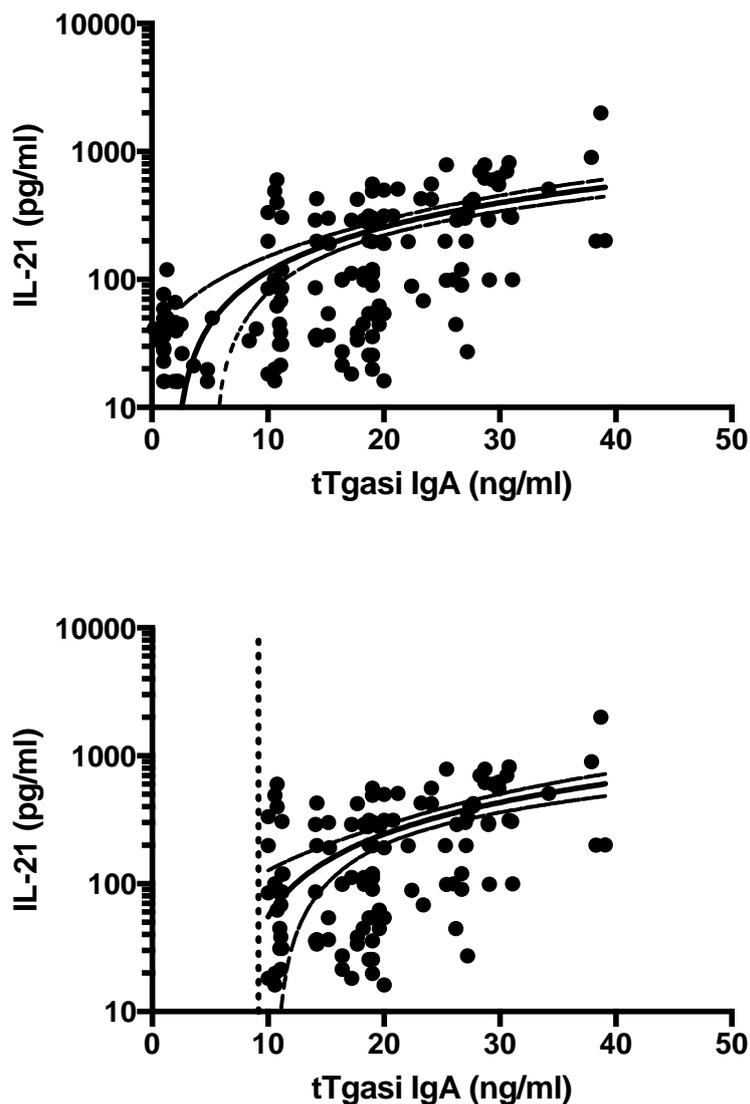


Figura 2. Correlazione tra le concentrazioni di autoanticorpi IgA anti-tTG sierici e IL-21 in pazienti con CD.

A. Le analisi di valutazione sui sieri evidenziano che esiste una correlazione significativa e positiva tra la concentrazione plasmatica di IL-21 e gli autoanticorpi IgA anti-tTG in tutti i pazienti con CD (n = 160; $r = 0,211$, $P < 0,0001$).

B. Correlazione simile è stata osservata anche tra i due parametri nei pazienti con CD non trattati (regime dietetico libero) (n = 120; $r = 0,475$, $P < 0,0001$). Una linea verticale tratteggiata rappresenta il valore di cut-off di 9 ng/ml per gli autoanticorpi IgA anti-tTG (come suggerito dai protocolli del produttore).

Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di confidenza del 95% della linea più adatta (linee continue).

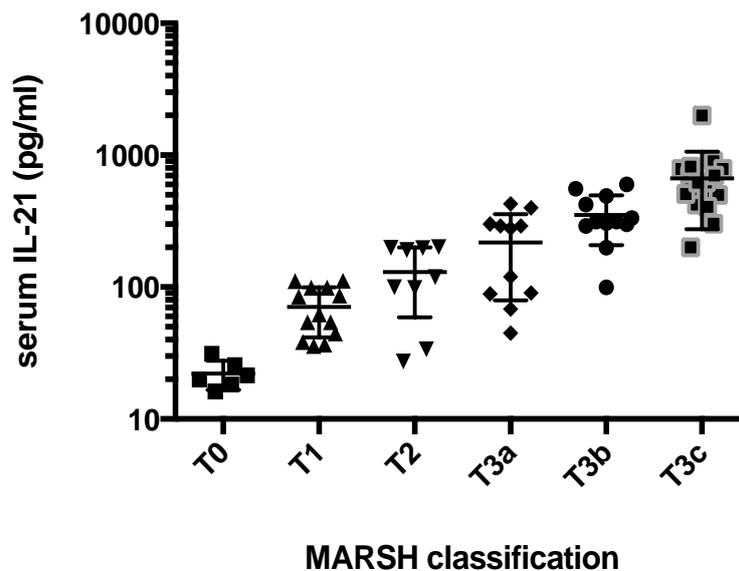


Figura 3. Correlazione tra i livelli sierici di IL-21 e i danni alla mucosa secondo la classificazione modificata di Marsh.

Vengono mostrati i dati di pazienti con CD non trattati e CD che hanno seguito una dieta senza glutine. Una correlazione positiva significativa è stata osservata quando i livelli plasmatici di IL-21 sono stati confrontati con il grado di danno alla mucosa intestinale (classificato come classificazione Marsh) ($n = 67$; $r = 0,887$, $P < 0,0001$).

DISCUSSIONE

La celiachia (CD) è una patologia autoimmune caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi e linfociti T, che agiscono simultaneamente come effettori nella formazione del danno tissutale a livello della mucosa duodenale [162,163,164]. I risultati ottenuti tramite analisi genetiche, cliniche e di laboratorio su pazienti affetti da celiachia, hanno dimostrato che la patologia viene a determinarsi a causa della presenza e dunque dell'attività di specifiche cellule T reattive per il glutine, quali CD4⁺ ma, successivamente è stata evidenziata una correlazione fra le cellule CD4⁺ e i linfociti T CD8⁺ nonché le cellule B.

Il coinvolgimento di quest'ultime in particolare è basato sull'interazione funzionale che si viene a creare con le cellule T CD4⁺, portando così alla produzione di anticorpi anti-tTG. È importante notare che il coinvolgimento delle cellule B fungerà da circuito amplificatore per le stesse cellule T: i peptidi saranno selezionati come substrati specifici per il tTG e come epitopi per i linfociti T. Tutte queste osservazioni portano a supporre che la risposta dettata dalle cellule T anti-glutine debba raggiungere una precisa importanza per diventare patogena [165].

Inoltre i meccanismi deputati allo sviluppo della patogenesi, svolgono un ruolo chiave nella sotto modulazione dei processi infiammatori: le cellule T regolatorie (Treg) sembrano assumere un effetto inibitorio massimo sulle Th1 [162,163,164], infatti dalla letteratura si evidenzia che i cloni di cellule T CD4 + sensibili al glutine, appartengono alla classe di linfociti T helper 1 (Th1). In effetti questo gruppo di cellule produce principalmente IFN- γ , in combinazione con la secrezione di altre citochine come IL-4, IL-5, IL-10, TNF e TGF- β . Gli alti livelli prodotti di IL-10 da parte di molte cellule T, suggeriscono che alcune di queste cellule sensibili al glutine, rappresentano la classe Treg di tipo 1, nonostante la produzione di IFN- γ [166]. In alternativa, questo potrebbe essere interpretato come un fenomeno di autocontrollo esercitato dalle cellule Th1 stesse [167]. Pertanto, le citochine, o una combinazione di esse, potrebbe svolgere il ruolo di molecola modulatrice delle funzioni dei Treg stessi. Dopo l'esposizione al glutine, per via orale o per iniezione intradermica, i pazienti trattati presentavano sintomi gastrointestinali, probabilmente correlati con la produzione sistemica di citochine, in particolare i livelli quantitativi di IL-2 e IL-8 risultavano essere maggiori a 2 ore dall'esposizione rispetto all'insorgenza dei sintomi [168,169].

Di recente, è stato dimostrato che, nella mucosa duodenale del CD, i linfociti T CD4⁺ risultano essere già attivati e differenziati in cellule effettrici Th1 e, i meccanismi regolatori che stanno alla base

assumono un ruolo cruciale nel down-regolare i processi di infiammazione che si verranno a formare in queste prime fasi del CD [170]. Possiamo quindi considerare i Treg come la popolazione principale coinvolta nella repressione dell'attività di Th1. Da notare che Treg è presente e attivo nel CD [171.]. È possibile quindi che le funzioni di Treg siano regolate dalle citochine prodotte localmente e, una particolare combinazione di queste, sia responsabile della progressione del danno alla mucosa [172,173]; a tal proposito l'IL-21 potrebbe avere un ruolo chiave in questo processo influenzando allo stesso tempo sia lo stato infiammatorio della mucosa che la capacità soppressiva di Treg e / o, in caso contrario, la risposta delle cellule effettrici a Treg.

L'IL-21 mostra un ampio campo d'azione a seconda dei segnali ambientali che la circondano e di conseguenza può agire andando a modulare sia le risposte immunitarie di tipo umorale che quelle di tipo cellulare. Sembra agire su diverse linee cellulari, comprese non solo quelle immunitarie (es. cellule T CD4⁺ e CD8⁺, cellule Treg, cellule B, NK e DCs), ma anche cellule epiteliali, cellule sinoviali, cellule stromali e cellule endoteliali [174]. L'IL-21 sembra avere un ruolo fondamentale nella produzione di TGF- β , un fattore chiave nel pathway di differenziazione delle cellule T CD4⁺ umane in cellule Th-17 ; studi su cellule di tipo umano infatti hanno dimostrato che l'IL-21 può anche promuovere la differenziazione di Th1, migliorando così l'espressione dei fattori di trascrizione associati a Th1 e aumentando la produzione di IFN- γ [175]. Essa è in grado anche di regolare negativamente la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche, inoltre sembra antagonizzare l'espressione mediata da TGF- β di Foxp3, inibendo così la differenziazione periferica dei Treg [176,177]. Alcuni dati indicano che l'IL-21 contribuisca alla generazione di Treg, i quali presentano un ruolo chiave per la produzione dell'IL-10 di tipo 1, agendo con azioni immunosoppressive [178]. D'altra parte, IL-21 ha dimostrato di rendere le cellule T CD4⁺ resistenti agli effetti soppressivi di Treg [179,180]. Infine, sembra svolgere un ruolo cruciale nella regolazione dei meccanismi di proliferazione delle cellule B; risulta essere necessaria per la corretta formazione del centro germinale (GC), la differenziazione delle plasmacellule, la produzione di immunoglobuline e l'isotipo di commutazione [181,182]. Pertanto, la sua assenza potrebbe spiegare la mancanza di progressione verso il danno della mucosa.

In effetti, nel modello sperimentale NOD per il diabete di tipo 1, durante la fase di insulite, la mancanza di segnalazione di IL-21 protegge i topi NOD, ma quando si sviluppa un danno pancreatico, i livelli di IL-21 aumentano [183]. La sovraespressione di IL-21 nelle cellule β del pancreas induce citochine infiammatorie e chemochine tra cui IL-17A, IL-17F e IFN- γ e le proteine chemiotattiche monociti-1 e -2 e neutralizza la capacità soppressiva delle cellule Treg con lo sviluppo del diabete di tipo 1 [184]. In conclusione, dato il gran numero di effetti che l'IL-21 manifesta sul sistema

immunitario, le è stato attribuito un ruolo determinante nell'inizio e nella progressione delle reazioni infiammatorie coinvolte in diverse malattie autoimmuni.

I nostri risultati dimostrano che i pazienti con CD non trattati hanno concentrazioni di IL-21 significativamente più elevate rispetto ai controlli, mentre il livello di IL-21 risulta essere più basso nei pazienti con CD trattati (seguendo una dieta priva di glutine). A questo punto possiamo presupporre che i soggetti trattati con terapie mirate, sviluppano una concentrazione quasi inosservabile di questa citochina: questo porterebbe a supporre un possibile ruolo del glutine come autoantigene, con funzione stimolante sulla produzione della citochina stessa. [185,186]. Inoltre, la scoperta di una correlazione positiva tra la quantità sierica di IL-21 e il grado di danno alla mucosa duodenale, suggerisce un possibile effetto immunomodulatore piuttosto rilevante da parte di questa citochina sulle funzioni dei linfociti T citotossici. Si potrebbe ipotizzare quindi che all'inizio dello sviluppo della patologia l'assenza di IL-21 porterebbe al fallimento di un circuito di feedback positivo che aiuterebbe ad amplificare e a stabilizzare la cellula Th1 già coinvolta. Infatti è noto che l' IL-21 migliora la secrezione di proteasi degradanti della matrice extracellulari da parte delle cellule stromali e chemiotattiche da parte delle cellule epiteliali [182], neutralizza le attività immunosoppressive delle cellule Treg [187,188,189,182]. Ciò potrebbe ulteriormente spiegare la correlazione tra i livelli sierici di IL-21 e il danno alla mucosa. Da notare che il meccanismo di danno alla mucosa duodenale è un processo generalmente lento che si evolve nel tempo, portando a una crescente gravità del danno che si conclude con una distruzione totale dei villi, definita come atrofia. Allo stesso modo la concentrazione di IL-21, può aumentare nel tempo sia in pazienti non diagnosticati sia in pazienti non trattati (ovvero che non seguono una dieta priva di glutine).

Tuttavia è stato ampiamente dimostrato che l'IL-21 svolge un ruolo chiave nei meccanismi di controllo delle cellule B e del plasma e, può contribuire anche alla produzione di autoanticorpi associati a CD [192,193,194]: di conseguenza, i nostri dati mostrano che i livelli sierici di IL-21 sono correlati ai titoli sierici di autoanticorpi anti-TG.

Precedentemente i dati mostravano che la densità delle cellule produttrici di IL-21 risultava essere più elevata a livello della lamina propria della mucosa duodenale (sia in esperimenti ex vivo che in vitro) [170; 171, 191]. Questi risultati suggeriscono che, nelle prime fasi del CD, le cellule T CD4⁺, IL-21 e cellule T specifiche per il glutine, sono presenti e predisposte a rispondere a stimoli adeguati. Pertanto, possiamo ipotizzare che, nella fase iniziale del CD, le cellule T CD4⁺ reattive al glutine siano controllate da meccanismi regolatori efficaci mentre durante la progressione della malattia, in presenza di stimoli specifici, queste cellule sono in grado di sintetizzare grandi quantità di IL-21, che andrà ad amplificare l'attuale infiammazione della mucosa e contribuirà all'atrofia dei villi duodenali.

In conclusione, i nostri risultati mostrano livelli elevati di IL-21 nel siero di pazienti con CD non trattato, confrontati con CD su dieta priva di glutine e donatori sani e, una correlazione della quantità di questa citochina con il danno della mucosa duodenale e la produzione degli autoanticorpi. Questo studio fornisce un'ulteriore prova dei dati emergenti sul potenziale ruolo dell'IL-21 nella patogenesi del CD.

Infine, lo sviluppo di molecole in grado di neutralizzare IL-21 (come gli anticorpi bloccanti o le proteine ricombinanti) costituisce un interessante target terapeutico per le malattie autoimmuni. Tuttavia, poiché l'IL-21 è coinvolta nei meccanismi di difesa dell'ospite contro infezioni e tumori, sono necessarie ulteriori indagini per valutarne la sua efficacia e, soprattutto, i potenziali eventi avversi in ambito clinico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol.* 2008 Sep;173(3):600-9. doi: 10.2353/ajpath.2008.071008. Epub 2008 Aug 7. PMID: 18688037; PMCID: PMC2527069.; Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012 Aug;11(10):754-65. doi: 10.1016/j.autrev.2012.02.001. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22387972.
- 2) Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med.* 1994 May;96(5):457-62. doi: 10.1016/0002-9343(94)90173-2. PMID: 8192178.
- 3) Di Florio DN, Sin J, Coronado MJ, Atwal PS, Fairweather D. Sex differences in inflammation, redox biology, mitochondria and autoimmunity. *Redox Biol.* 2020 Apr;31:101482. doi: 10.1016/j.redox.2020.101482. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32197947; PMCID: PMC7212489.
- 4) Chapter 4 Sex Hormone Receptor Expression in the Immune System ; Sex Differences in Physiology Iwona A. Buskiewicz, Sally A. Huber, DeLisa Fairweather, Elsevier 2016
- 5) Frisancho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, Barrett MA, Gatewood SJ, Njoku DB, Cihakova D, Silbergeld EK, Rose NR, Fairweather D. Cutting edge: T cell Ig mucin-3 reduces inflammatory heart disease by increasing CTLA-4 during innate immunity. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6411-5. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6411. PMID: 16709797.

- 6) DeLisa Fairweather, Michelle A Petri, Michael J Coronado & Leslie T Cooperr (2012) Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis, *Expert Review of Clinical Immunology*, 8:3, 269-284, DOI: [10.1586/eci.12.10](https://doi.org/10.1586/eci.12.10)
- 7) Cook IF. Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine*. 2008 Jul 4;26(29-30):3551-5. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.054. Epub 2008 May 9.
- 8) Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2017 Oct 6;33:577-599. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060718. PMID: 28992436.
- 9) Aristimuño, C., Teijeiro, R., Valor, L. et al. Sex-hormone receptors pattern on regulatory T-cells: clinical implications for multiple sclerosis. *Clin Exp Med* 12, 247–255 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10238-011-0172-3>
- 10) Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 2001 Aug;7(8):899-905. doi: 10.1038/90935. PMID: 11479621
- 11) Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH, Badenhoop K. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4130-2. doi: 10.1210/jcem.82.12.4406. PMID: 9398726
- 12) Holopainen, P. et al. CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens* 53, 470–475 (1999)
- 13) Seko Y, Takahashi N, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of costimulatory molecule CD40 in murine heart with acute myocarditis and reduction of inflammation by treatment with anti-CD40L/B7-1 monoclonal antibodies. *Circ Res*. 1998 Aug 24;83(4):463-9. doi: 10.1161/01.res.83.4.463. PMID: 9721703.
- 14) Rose NR. Prediction and Prevention of Autoimmune Disease in the 21st Century: A Review and Preview. *Am J Epidemiol*. 2016 Mar 1;183(5):403-6. doi: 10.1093/aje/kwv292. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26888748

- 15) Boisset JC, Robin C. On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res.* 2012 Jan;8(1):1-13. doi: 10.1016/j.scr.2011.07.002. Epub 2011 Jul 30. PMID: 22099016
- 16) Sarrazin S, Sieweke M. Integration of cytokine and transcription factor signals in hematopoietic stem cell commitment. *Semin Immunol.* 2011 Oct;23(5):326-34. doi: 10.1016/j.smim.2011.08.011. Epub 2011 Sep 19. PMID: 21937237
- 17) Moresco EM, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol.* 2011 Jul 12;21(13):R488-93. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.039. PMID: 21741580
- 18) Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012 Jan 18;481(7381):278-86. doi: 10.1038/nature10759. PMID: 22258606
- 19) Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol.* 2012 Feb;42(2):278-83. doi: 10.1002/eji.201142231. PMID: 22359100
- 20) Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744. Epub 2001 Dec 7. PMID: 11861619
- 21) Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010 Nov 24;33(5):657-70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011. PMID: 21094463
- 22) Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011 Feb;21(2):290-304. doi: 10.1038/cr.2010.150. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21060338; PMCID: PMC3193439.
- 23) Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720. PMID: 16551246.
- 24) Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011 Oct 19;12(11):1035-44. doi: 10.1038/ni.2109. PMID: 22012443; PMCID: PMC3412172
- 25) Devitt A, Marshall LJ. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2011 Sep;90(3):447-57. doi: 10.1189/jlb.0211095. Epub 2011 May 11. PMID: 21562053.

- 26) Shi, F., Ljunggren, H., La Cava, A. *et al.* Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* **11**, 658–671 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3065>
- 27) Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspord C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:118-42. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x. PMID: 17850486.
- 28) Contreras V, Urien C, Guiton R, Alexandre Y, Vu Manh TP, Andrieu T, Crozat K, Jouneau L, Bertho N, Epardaud M, Hope J, Savina A, Amigorena S, Bonneau M, Dalod M, Schwartz-Cornil I. Existence of CD8 α -like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3313-25. doi: 10.4049/jimmunol.1000824. Epub 2010 Aug 11. PMID: 20702727.
- 29) Pierdominici M, Vomero M, Barbati C, Colasanti T, Maselli A, Vacirca D, Giovannetti A, Malorni W, Ortona E. Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. *FASEB J.* 2012 Apr;26(4):1400-12. doi: 10.1096/fj.11-194175. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22247332.
- 30) Aguzzi A, Krautler NJ. Characterizing follicular dendritic cells: A progress report. *Eur J Immunol.* 2010 Aug;40(8):2134-8. doi: 10.1002/eji.201040765. PMID: 20853499
- 31) Dooley J, Liston A. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur J Immunol.* 2012 May;42(5):1073-9. doi: 10.1002/eji.201142305. PMID: 22539280
- 32) Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107. Epub 2002 Oct 16. PMID: 12414722
- 33) Metzger TC, Anderson MS. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev.* 2011 May;241(1):89-103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01008.x. PMID: 21488892; PMCID: PMC3093413
- 34) Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:253-300. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861604

35) Geier JK, Schlissel MS. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Semin Immunol.* 2006 Feb;18(1):31-9. doi: 10.1016/j.smim.2005.11.001. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16386923.

36) Chapter 5 - Innate and Adaptive Systems of Immunity Peter J.Delves

37) Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996 Jan 1;156(1):5-7. PMID: 8598493

38) Jones LS, Rizzo LV, Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol.* 1997 Jun 15;158(12):5997-6005. PMID: 9190954.

39) Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Billiau A. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1998 Jul;28(7):2143-51. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2143::AID-IMMU2143>3.0.CO;2-C. PMID: 9692883.

40) Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000 Nov;13(5):715-25. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4. PMID: 11114383.

41) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003 Feb 13;421(6924):744-8. doi: 10.1038/nature01355. PMID: 12610626.

42) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40. doi: 10.1084/jem.20041257. PMID: 15657292; PMCID: PMC2212798.

- 43) Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):353-61. doi: 10.1016/j.smim.2007.10.008. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18023589
- 44) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):231-4. doi: 10.1038/nature04754. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648837.
- 45) Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):484-487. doi: 10.1038/nature05970. Epub 2007 Jun 20. PMID: 17581588; PMCID: PMC3805028
- 46) Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):480-3. doi: 10.1038/nature05969. Epub 2007 Jun 20. PMID: 17581589.
- 47) Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):967-74. doi: 10.1038/ni1488. Epub 2007 Jun 20. PMID: 17581537.
- 48) Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 2009 Apr 17;30(4):576-87. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007. Epub 2009 Apr 9. PMID: 19362022; PMCID: PMC2705871.
- 49) Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):641-9. doi: 10.1038/ni.1610. Epub 2008 May 4. PMID: 18454151; PMCID: PMC2597394
- 50) Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008

Jan;28(1):29-39. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.016. Epub 2007 Dec 27. PMID: 18164222; PMCID: PMC2587175.

51) Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):146-52. doi: 10.1016/j.coi.2009.03.001. Epub 2009 Mar 26. PMID: 19328669; PMCID: PMC2701391.

52) Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012 Oct 12;151(2):289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23021777; PMCID: PMC3503487.

53) Huber M, Brüstle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, Mahiny A, von Löw E, Lohoff M. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 30;105(52):20846-51. doi: 10.1073/pnas.0809077106. Epub 2008 Dec 16. PMID: 19088203; PMCID: PMC2634912

54) Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee WL, Smith WA, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemerski S, Hatton RD, Stormo GD, Weaver CT, Russell JH, Murphy TL, Murphy KM. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature.* 2009 Jul 16;460(7253):405-9. doi: 10.1038/nature08114. Epub 2009 Jul 5. PMID: 19578362; PMCID: PMC2716014.

55) Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brüstle O. Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One.* 2007 Mar 14;2(3):e298. doi: 10.1371/journal.pone.0000298. PMID: 17356704; PMCID: PMC1808430.

56) Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012 Oct 12;151(2):289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23021777; PMCID: PMC3503487.

57) Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of

follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2009 Feb;10(2):167-75. doi: 10.1038/ni.1690. Epub 2008 Dec 21. PMID: 19098919; PMCID: PMC2742982.

58) Rutz S, Noubade R, Eidenschenk C, Ota N, Zeng W, Zheng Y, Hackney J, Ding J, Singh H, Ouyang W. Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. *Nat Immunol.* 2011 Oct 16;12(12):1238-45. doi: 10.1038/ni.2134. PMID: 22001828.

59) Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1051-7. doi: 10.1038/nature07036. PMID: 18563156; PMCID: PMC6280661

60) Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012 Oct 12;151(2):289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23021777; PMCID: PMC3503487.

61) Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, Jin H, Lee Y, Awasthi A, Wu C, Karwacz K, Xiao S, Jorgolli M, Gennert D, Satija R, Shakya A, Lu DY, Trombetta JJ, Pillai MR, Ratcliffe PJ, Coleman ML, Bix M, Tantin D, Park H, Kuchroo VK, Regev A. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):461-8. doi: 10.1038/nature11981. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23467089; PMCID: PMC3637864.

62) Cypowyj S, Picard C, Maródi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol.* 2012 Sep;42(9):2246-54. doi: 10.1002/eji.201242605. PMID: 22949323; PMCID: PMC3720135.

63) Matusiewicz D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999 Apr;5(2):101-4. doi: 10.1177/135245859900500206. PMID: 10335518.

64) Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 2003 Dec 1;171(11):6173-7. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6173. PMID: 14634133.

- 65) Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):108-19. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.009. PMID: 19144317.
- 66) Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary P, Yeilding N, Guzzo C, Hsu MC, Wang Y, Li S, Dooley LT, Reich K; PHOENIX 2 study investigators. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*. 2008 May 17;371(9625):1675-84. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60726-6. PMID: 18486740.
- 67) Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum*. 2010 Apr;62(4):929-39. doi: 10.1002/art.27334. PMID: 20131262.
- 68) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T_H17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- 69) Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001. PMID: 16473830.
- 70) Zhou, L., Lopes, J., Chong, M. *et al.* TGF-β-induced Foxp3 inhibits T_H17 cell differentiation by antagonizing RORγt function. *Nature* **453**, 236–240 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06878>
- 71) Du J, Huang C, Zhou B, Ziegler SF. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4785-92. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4785. PMID: 18354202.
- 72) Arian Laurence, Cristina M. Tato, Todd S. Davidson, Yuka Kanno, Zhi Chen, Zhengju Yao, Rebecca B. Blank, Françoise Meylan, Richard Siegel, Lothar Hennighausen, Ethan M. Shevach, John J. O'Shea, Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation, *Immunity*, Volume 26, Issue 3, 2007, Pages 371-381,ISSN 1074-7613, doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009.

- 73) Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*. 2011 Jul 4;208(7):1367-76. doi: 10.1084/jem.20110278. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21708926; PMCID: PMC3135370.
- 74) Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011 Sep 2;146(5):772-84. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.033. Epub 2011 Aug 25. PMID: 21871655; PMCID: PMC3387678.
- 75) Huber S, Gagliani N, Flavell RA. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *Eur J Immunol*. 2012 Sep;42(9):2238-45. doi: 10.1002/eji.201242619. PMID: 22949322
- 76) Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*. 2010 Jun 25;32(6):815-27. doi: 10.1016/j.immuni.2010.06.001. PMID: 20620945; PMCID: PMC2904693
- 77) Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*. 2011 Oct 26;479(7374):538-41. doi: 10.1038/nature10554. PMID: 22031325
- 78) Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J. *et al.* Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic T_H17 cells. *Nature* **496**, 518–522 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11868>
- 79) Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T. *et al.* Induction of pathogenic T_H17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**, 513–517 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11984>
- 80) Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N. *et al.* Control of T_H17 cells occurs in the small intestine. *Nature* **475**, 514–518 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10228>
- 81) Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*. 2004 Jul 1;173(1):68-78. doi: 10.4049/jimmunol.173.1.68. PMID: 15210760
- 82) Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, Ramiscal RR, Chan TD, Gatto D, Brink R, Yu D, Fagarasan S, Tarlinton DM, Cunningham AF, Vinuesa CG. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med*. 2011 Jul

4;208(7):1377-88. doi: 10.1084/jem.20102065. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21708925; PMCID: PMC3135363.

83) King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:741-66. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090344. PMID: 18173374

84) Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-63. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400. PMID: 21314428

85) Hsu, HC., Yang, P., Wang, J. *et al.* Interleukin 17–producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* **9**, 166–175 (2008). <https://doi.org/10.1038/ni1552>

86) Zhang X, Ing S, Fraser A, Chen M, Khan O, Zakem J, Davis W, Quinet R. Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases. *Ochsner J.* 2013 Spring;13(1):131-9. PMID: 23531878; PMCID: PMC3603176

87) Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011 Jan 28;34(1):108-21. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.012. Epub 2011 Jan 6. Erratum in: *Immunity.* 2011 Jan 28;34(1):135. PMID: 21215658; PMCID: PMC3046815

88) Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo SE, Mao C, Wu W, Chen J, Tong J, Yang M, Jiao Z, Xu H, Lu L, Wang S. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:827480. doi: 10.1155/2012/827480. Epub 2012 May 10. PMID: 22649468; PMCID: PMC3357937.

89) Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 May;13(5):379-95. doi: 10.1038/nrd4296. Epub 2014 Apr 22. PMID: 24751819.; Bhave NS, Carson WE 3rd. Immune modulation with interleukin-21. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Dec;1182:39-46. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05071.x. PMID: 20074273

90) Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):856-63. PMID: 12429707 ; Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005 Sep;5(9):688-98. doi: 10.1038/nri1688. PMID: 16138102

- 91) Leonard, W. J. in *Fundamental Immunology* 5th Edn (ed. Paul, W. E.) 701–747 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003) ; Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature Rev. Immunol.* 1, 200–208 (2001).
- 92) Noguchi, M. et al. Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147–157 (1993)
- 93) Zhang JL, Foster D, Sebald W. Human IL-21 and IL-4 bind to partially overlapping epitopes of common gamma-chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 10;300(2):291-6. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02836-x. PMID: 12504082
- 94) Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature Rev. Immunol.* 1, 200–208 (2001); Russell, S. M. et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 270, 797–800 (1995)
- 95) Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P. R. & Leonard, W. J. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 11439–11444 (2000)
- 96) Parrish-Novak, J. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63 (2000)
- 97) Bennett, F. et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J. Immunol.* 170, 711–718 (2003)
- 98) Strengell, M. et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. *J. Immunol.* 170, 5464–5469 (2003)
- 99) Lin, J.-X. et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2, 331–339 (1995)
- 100) Lin, J.-X., Mietz, J., Modi, W. S., John, S. & Leonard, W. J. Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2- induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 10738–10744 (1996)
- 101) Hou, J. et al. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265, 1701–1706 (1994).

- 102) Quelle, F. W. et al. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3336–3343 (1995)
- 103) Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A. & Fu, X. Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5328–5337 (1997)
- 104) Stephanou, A. & Latchman, D. S. STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, 239–244 (2003)
- 105) Yu, C. L. et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3- related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81–83 (1995)
- 106) Bromberg, J. & Darnell, J. E. Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468–2473 (2000).
- 107) Jin, H., Carrio, R., Yu, A. & Malek, T. R. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J. Immunol.* 173, 657–665 (2004).
- 108) Distler, J. H. et al. Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 52, 856–864 (2005)
- 109) Eberl, M., Engel, R., Beck, E. & Jomaa, H. Differentiation of human $\gamma\delta$ T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell. Immunol.* 218, 1–6 (2002).
- 110) Brandt, K. et al. Interleukin-21 inhibits dendritic cell mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1379–1382 (2003).
- 111) Oettgen, H. C. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of ϵ germline transcripts. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 618–623 (2000).
- 112) Long D, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2019 May;99:1-14. doi: 10.1016/j.jaut.2019.01.013. Epub 2019 Feb 14. Erratum in: *J Autoimmun.* 2020 Jul;111:102455. PMID: 30773373
- 113) Strengell, M., Julkunen, I. & Matikainen, S. IFN- α regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J. Leukoc. Biol.* 76, 416–422 (2004)

- 114) Kim, H.-P., Korn, L. L., Gamero, A. M. & Leonard, W. J. Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. *J. Biol. Chem.* 280, 25291–25297 (2005).
- 115) Eberl, M., Engel, R., Beck, E. & Jomaa, H. Differentiation of human $\gamma\delta$ T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell. Immunol.* 218, 1–6 (2002)
- 116) Bhave NS, Carson WE 3rd. Immune modulation with interleukin-21. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Dec;1182:39-46. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05071.x. PMID: 20074273
- 117) Zeng, R. et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* 201, 139–148 (2005)
- 118) Wurster, A. L. et al. Interleukin 21 is a T helper (TH) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive TH cells into interferon γ -producing TH1 cells. *J. Exp. Med.* 196, 969–977 (2002)
- 119) Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M. J. & Nutt, S. L. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J. Immunol.* 172, 2048–2058 (2004)
- 120) Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunol.* 1, 426–432 (2000)
- 121) Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591–599 (1998).
- 122) Habib T, Nelson A, Kaushansky K. IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec;112(6):1033-45. doi: 10.1016/j.jaci.2003.08.039. PMID: 14657853
- 123) Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):57-63. doi: 10.1038/35040504. PMID: 11081504
- 124) Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA, Grusby MJ. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from

innate to adaptive immunity. *Immunity*. 2002 Apr;16(4):559-69. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00295-9. PMID: 11970879.

125) Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:57-79. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090316. PMID: 17953510

126) Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, et al. 2003. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res*. 63:9016–22

127) Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Ruckert R. 2003. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090–98

128) Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, et al. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448:484–87

129) Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, et al. 2007. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 8:967–74

130) Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garafalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):255-63. doi: 10.1038/ni.1993. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21278737; PMCID: PMC3040235.

131) Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400. PMID: 21314428.

132) Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol*. 2009 Apr;10(4):385-93. doi: 10.1038/ni.1715. Epub 2009 Mar 1. PMID: 19252490; PMCID: PMC2714053

133) Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 2009 Mar 13;323(5920):1488-92. doi: 10.1126/science.1169152. PMID: 19286559.

134) Liu SM, King C. IL-21-producing Th cells in immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 2013 Oct 1;191(7):3501-6. doi: 10.4049/jimmunol.1301454. PMID: 24058193.

135) Curley CR, Monsuur AJ, Wapenaar MC, et al. A functional candidate screen for coeliac disease genes. *Eur J Hum Genet* 2006;14:1215–22

- 136) Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, et al. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 2004;173:1757–62
- 137) Mowat AM. Coeliac disease: a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet* 2003;361:1290–2.
- 138) Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J Immunol* 2006;176:2512–21
- 139) Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;362:30–7.
- 149) Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 2006;55:469–77).
- 150) Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52:218–23.
- 151) Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:696–707
- 152) Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/ MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;21:367–77
- 153) Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;21:357–66
- 154) Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, et al. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 1995;37:766– 76
- 155) Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175:1373–81.
- 156) Garrote JA, Gómez-González E, Bernardo D, Arranz E, Chirido F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Aug;47 Suppl 1:S27-32. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181818fb9. PMID: 18667914.)

- 157) Iervasi E, Auricchio R, Strangio A, Greco L, Saverino D. Serum IL-21 levels from celiac disease patients correlates with anti-tTG IgA autoantibodies and mucosal damage. *Autoimmunity*. 2020 Jun;53(4):225-230. doi: 10.1080/08916934.2020.1736047. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32157915.
- 158) Borrelli M, Gianfrani C, Lania G, Aitoro R, Ferrara K, Nanayakkara M, Ponticelli D, Zanzi D, Discepolo V, Vitale S, Barone MV, Troncone R, Auricchio R, Maglio M. In the Intestinal Mucosa of Children With Potential Celiac Disease IL-21 and IL-17A are Less Expressed than in the Active Disease. *Am J Gastroenterol*. 2016 Jan;111(1):134-44. doi: 10.1038/ajg.2015.390. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26753888
- 159) van Leeuwen MA , Lindenberg-Kortleve DJ , Raatgeep HC et al. Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease . *Mucosal Immunol* 2013 ; 6 : 1202 – 13
- 160) Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child*. 1990 Aug;65(8):909-11. doi: 10.1136/adc.65.8.909. PMID: 2205160; PMCID: PMC1792502.
- 161) Simone R, Brizzolara R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Natale C, Greco L, Schiavo M, Bagnasco M, Pesce G, Saverino D. A functional soluble form of CTLA-4 is present in the serum of celiac patients and correlates with mucosal injury. *Int Immunol*. 2009 Sep;21(9):1037-45. doi: 10.1093/intimm/dxp069. Epub 2009 Jul 22. PMID: 19625381.
- 162) Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr*. 2018 Nov 21;6:350. doi: 10.3389/fped.2018.00350. PMID: 30519552; PMCID: PMC6258800.
- 163) Lebowitz B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *Lancet*. 2018 Jan 6;391(10115):70-81. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28760445.
- 164) Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301346. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22345659; PMCID: PMC3440559.
- 165) Jabri B, Sollid LM. T Cells in Celiac Disease. *J Immunol*. 2017 Apr 15;198(8):3005-3014. doi: 10.4049/jimmunol.1601693. PMID: 28373482; PMCID: PMC5426360.
- 166) Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells

from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):4178-86. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.4178. PMID: 16951383.

167) O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):425-8. doi: 10.1038/nri2097. PMID: 17525751.

168) Goel G, Tye-Din JA, Qiao SW, Russell AK, Mayassi T, Ciszewski C, Sarna VK, Wang S, Goldstein KE, Dzuris JL, Williams LJ, Xavier RJ, Lundin KEA, Jabri B, Sollid LM, Anderson RP. Cytokine release and gastrointestinal symptoms after gluten challenge in celiac disease. *Sci Adv*. 2019 Aug 7;5(8):eaaw7756. doi: 10.1126/sciadv.aaw7756. PMID: 31457091; PMCID: PMC6685723.

169) Goel G, King T, Daveson AJ, Andrews JM, Krishnarajah J, Krause R, Brown GJE, Fogel R, Barish CF, Epstein R, Kinney TP, Miner PB Jr, Tye-Din JA, Girardin A, Taavela J, Popp A, Sidney J, Mäki M, Goldstein KE, Griffin PH, Wang S, Dzuris JL, Williams LJ, Sette A, Xavier RJ, Sollid LM, Jabri B, Anderson RP. Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul;2(7):479-493. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30110-3. Epub 2017 May 11. PMID: 28506538; PMCID: PMC5676538.

170) Borrelli M, Salvati VM, Maglio M et al. (2013) Immunoregulatory pathways are active in the small intestinal mucosa of patients with potential celiac disease. *Am J Gastroenterol* 108:1775–1784

171) Sarra M, Pallone F, Monteleone G. (2013) Interleukin-21 in chronic inflammatory diseases. *Biofactors* 39:368-373

172) Borrelli M, Gianfrani C, Lania G, et al. (2016) In the Intestinal Mucosa of Children with Potential Celiac Disease IL-21 and IL-17A are Less Expressed than in the Active Disease. *Am J Gastroenterol* 111:134-144

173) Cielo D, Galatola M, Fernandez-Jimenez N, et al. (2019) Combined analysis of methylation and gene expression profiles in separate compartments of small bowel mucosa identified celiac disease patients' signatures. *Sci Rep* 9:10020

174) Sutherland AP , Van Belle T , Wurster AL et al. (2009) Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58:1144–1155

175) Strengell M, Matikainen S, Sirén J, et al. (2003) IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. *J Immunol* 170:5464–5469. Brandt K, Bulfone-Paus S,

- Foster DC, et al. (2003) Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090–4098
- 176) Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484–487.
- 177) Jabri B, Chen X, Sollid LM. (2014) How T cells taste gluten in celiac disease. *Nat Struct Mol Biol* 21: 429-431
- 178) Pot C, Jin H, Awasthi A, et al. (2009) IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21 and costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol* 183:797–801
- 179) Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, et al. (2006) Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 177: 4178–4186.
- 180) Peluso I, Fantini MC, Fina D, et al. (2007) IL-21 counteracts the regulatory T cell mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 178:732–739.
- 181) Pène J, Gauchat JF, Lécart S, et al. (2004) Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG₁ and IgG₃ by Human B Cells. *J Immunol* 172:5154-5157.
- 182) Konforte D, Simard N, Paige CJ. (2009) IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol* 182:1781–1787.
- 183) Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL et al. (2009) Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58:1144–1155
- 184) Clough LE, Wang CJ, Schmidt EM et al. (2008) Release from regulatory T cell mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J Immunol* 180:5393–5401
- 185) Galatola M, Izzo V, Cielo D, et al. (2013) Gene Expression Profile of Peripheral Blood Monocytes: A Step towards the Molecular Diagnosis of Celiac Disease? *PlosOne* 8:e74747
- 186) Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M et al. (2002) Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in celiac disease. *Gut* 50:186–189.

- 187) Mazzearella G (2015) Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World J Gastroenterol* 21:7349-7356.
- 188) Clough LE, Wang CJ, Schmidt EM et al. (2008) Release from regulatory T cell mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J Immunol* 180:5393–5401.
- 189) Zanzi D, Stefanile R , Santagata S et al. (2011) IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Am J Gastroenterol* 106:1308–1317.
- 190) Jabri B, Sollid LM. (2017) T Cells in Celiac Disease. *J Immunol* 198:3005-3014.;
- 191) Ozaki R, Spolski CG, Chen-Feng Qi F, Cheng J, et al. (2002) Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* 298:1630-1634.
- 192) Jin H, Carrio R, Yu A *et al.* (2004) Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol* 173:657–65