

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
"Amedeo Avogadro"**

**Dottorato di Ricerca
in Medicina Molecolare
(XX Ciclo)**

**Relazione 2°anno:
Studio degli effetti sulle APC
dell'interazione ICOS/B7h**

Responsabile scientifico:

Prof. Umberto Dianzani

Dottoranda:

Ilaria Seren Bernardone

Introduzione

Un'efficace risposta immunitaria coinvolge due principali gruppi di cellule: i linfociti e le cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells*, APC).

I linfociti, come gli altri globuli bianchi originano nel midollo osseo. Circolano nel sangue e nel sistema linfatico e risiedono in vari organi linfatici. Poiché producono ed esprimono recettori di superficie capaci di legare l'antigene, i linfociti sono i mediatori delle caratteristiche di specificità, diversità, memoria e discriminazione tra *self* e *not-self*. I linfociti si dividono in due principali popolazioni: linfociti T, responsabili della risposta cellulo-mediata, e linfociti B, responsabili della risposta umorale.

Le APC invece hanno il compito di garantire una fine regolazione dell'attivazione linfocitaria: infatti i linfociti sono in grado di riconoscere solo gli antigeni presentati dalle APC. Sono APC i macrofagi, le cellule dendritiche e i linfociti B stessi. Esse esprimono in membrana molecole MHC di classe II e sono in grado di trasmettere un segnale costimolatorio per i linfociti; una volta riconosciuto un antigene lo internalizzano, lo processano e lo riespongono sulla membrana associato alle molecole MHC di classe II, in modo tale che possa essere riconosciuto dai linfociti T *helper*. [Goldsby R.A. et al., 2000]

1. I linfociti T

I linfociti T nascono nel midollo osseo e maturano nel timo, dove esprimono i vari recettori di superficie che li caratterizzano.

1.1 Le molecole di superficie dei linfociti T

Il più importante complesso transmembrana sulla superficie dei linfociti T è costituito dal *T cell receptor* (TCR) associato a CD3: il TCR riconosce e lega l'antigene nella zona aminotermine, mentre CD3 svolge la funzione di trasduzione del segnale. Il TCR è un eterodimero costituito dall'associazione di due catene proteiche α e β oppure γ e δ unite tra loro da ponti disolfuro. Le estremità amino-terminali delle due catene proteiche rappresentano la parte variabile della molecola, e si ripiegano a formare la tasca del TCR destinata a legare l'antigene. A differenza delle immunoglobuline che riconoscono l'antigene come tale, il TCR riconosce l'antigene (in genere un peptide di otto-quindici amminoacidi) esclusivamente se associato con le molecole del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC). Una sequenza di residui amminoacidici idrofobici forma la porzione transmembrana. Una caratteristica singolare di tale regione è la presenza di residui carichi positivamente che interagiscono con amminoacidi carichi negativamente

presenti nella porzione transmembrana dei polipeptidi del complesso CD3. Le catene α e β possiedono code C-terminali intracellulari di lunghezza pari a 5-12 aminoacidi, troppo brevi per possedere un'attività enzimatica intrinseca: per questo sono necessarie altre molecole associate al TCR per permettere la trasduzione del segnale. Il complesso CD3 è costituito dalle catene γ , δ , ϵ , ζ e η : le prime tre hanno un dominio extracellulare immunoglobulinico e contengono un singolo motivo ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) nella coda citoplasmatica. Il motivo ITAM è formato da circa 26 residui amminoacidici per lo più non conservati, in cui due sequenze Tyr-X-X-Leu sono separate da 6-8 residui. I residui tirosinici delle ITAM sono fosforilati, in risposta al riconoscimento dell'antigene da parte del TCR. Questo consente alle ITAM di legare proteine contenenti un dominio SH2, dando avvio ad una cascata d'eventi intracellulari. La catena ζ , presente come omodimero o come eterodimero se associato alla sua variante di *splicing* η , ha una ridotta regione extracellulare e contiene tre motivi ITAMs nella coda citoplasmatica.

Esistono poi una serie di molecole accessorie che hanno il compito o di rafforzare l'adesione dei linfociti T ad altri tipi cellulari, o di trasdurre segnali che potenziano la risposta dei linfociti T, o di regolare la migrazione dei linfociti T verso i vari distretti anatomici. I corecettori CD4 e CD8 si legano a regioni non polimorfe delle molecole MHC e in questo modo favoriscono l'adesione dei linfociti T alle APC o alle cellule bersaglio e partecipano agli eventi precoci di trasduzione del segnale che si verificano a seguito del riconoscimento da parte dei linfociti T dei complessi MHC-peptide espressi sulle APC. La trasduzione del segnale è in parte da attribuirsi all'associazione, a livello della coda citoplasmatica, con la tirosina-chinasi Lck. In base all'espressione di questi corecettori è possibile distinguere due sottopopolazioni di linfociti T: T helper, che esprimono CD4, e T citotossici, che esprimono CD8.

Nell'uomo esistono due categorie di molecole MHC: quelle di classe I comprendono HLA-A, HLA-B e HLA-C (riconosciute da CD8), mentre quelle di classe II HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ (riconosciute da CD4). Queste molecole sono caratterizzate da un elevato grado di polimorfismo nella popolazione, giustificato dal fatto che ciascuna molecola MHC ha una relativa selettività di legame con i peptici antigenici.

1.2 Le molecole costimolatorie

L'attivazione dei linfociti T rappresenta un evento centrale nella generazione della risposta immunitaria e ad essa consegue un'espansione clonale delle cellule immunocompetenti con l'acquisizione di funzioni effettrici [Janeway et al., 1993; Janeway et al., 1994;

Dianzani et al., 1995]. Secondo il modello d'attivazione classico (ipotesi del doppio segnale, [Bretscher P.A. et al., 1999]), i linfociti T necessitano, affinché siano indotte proliferazione e differenziamento in cellule effettrici, di due distinti segnali extracellulari: il primo è costituito dal legame del TCR e dei corecettori CD4 e CD8 al complesso MHC-peptide (presente sulla superficie delle APC); il secondo è fornito da molecole costimolatorie, i cui ligandi si trovano anch'essi sulle APC [Harding F.A. et al., 1992].

L'esposizione dei linfociti ai complessi MHC-antigene in assenza del secondo segnale accessorio induce uno stato di anergia clonale o morte cellulare programmata.

Le molecole costimolatorie modulano, potenziando o frenando, la risposta del TCR all'antigene: in particolare i costimolatori positivi abbassano il livello di soglia di attivazione linfocitaria, definito dal numero di TCR che devono essere stimolati per avere una risposta biologica. In condizioni di basse concentrazioni di antigene o di antigeni con scarsa capacità immunogena, la costimolazione è essenziale nell'innescare l'attivazione linfocitaria (Viola et al., 1996).

Le molecole costimolatorie si possono suddividere in due superfamiglie: quella delle immunoglobuline (comprende CD28, CTLA4, ICOS, PD-1 e BTLA) e quella del TNFR/TNF (comprende, tra le altre, CD40L, OX-40, CD27) (Chambers et al., 1999; Peggs Karl et al., 2005).

Il mio progetto di dottorato è finalizzato allo studio di ICOS e del suo ligando B7h.

1.2.1 La famiglia CD28

Le molecole della famiglia del CD28 sono caratterizzate da un dominio IgV-like extracellulare, da una porzione transmembrana e da una coda citoplasmatica. CD28, CTLA-4 (CD152) e ICOS mappano, nell'uomo, nella regione cromosomica 2q33: questa colocalizzazione suggerisce che i tre geni siano originati da duplicazione genica [Sharpe et al., 2002].

Queste tre molecole sono espresse in membrana come omodimeri, grazie a legami disolfuro tra residui di Cisteina nella regione extracellulare in posizione membrano-prossimale. Nella porzione intracitoplasmatica presentano un motivo comune: Tyr-Xaa-Xaa-Met (Tyr-Met-Asn-Met per CD28, Tyr-Met-Phe-Met per ICOS, e Tyr-Val-Lys-Met per CTLA-4). La fosforilazione della Tirosina in questi motivi permettere l'associazione con la subunità adattatrice p85 di PI3K; CD28 può inoltre legare Grb-2 tramite il residuo Asn, responsabile dell'esclusiva capacità di indurre la produzione di IL-2, e tramite domini ricchi in Prolina le chinasi Itk (IL-2 inducible T-cell kinase) ed Lck. Anche CTLA-4, a differenza di ICOS, presenta domini ricchi in Prolina ma un ligando per questi non è stato ancora

individuato [Sharpe et al., 2002; Prasad et al., 1994; Schneider, Prasad et al., 1995; Schneider, Cai et al., 1995].

CD28 e CTLA-4 presentano lo stesso motivo MYPPPY nella porzione extracellulare, che è responsabile dell'interazione con i ligandi, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86); ICOS, presenta invece il motivo FDPDPF, responsabile del legame con il suo unico recettore, B7h (B7rp1, GL50, B7H2, LICOS) [Schwartz et al., 2001; Stamper et al., 2001; Wang et al., 2002].

Nonostante l'analogia a livello aminoacidico, le tre molecole differiscono da un punto di vista funzionale. CD28 ed ICOS mediano segnali stimolatori per il linfocita, in sinergia o in momenti e microambienti diversi della risposta immunitaria; CTLA-4, invece, invia segnali inibitori che tendono ad attenuare la risposta linfocitaria.

CD28 è espresso costitutivamente sulla superficie del 90% dei linfociti T_H CD4⁺ e dal 50% dei CD8⁺ e agisce in sinergia con i segnali mediati dal TCR, modulando la regolazione genica indotta dal solo TCR, e potenziando le risposte T all'antigene (Riley et al., 2002; Diehn et al., 2002). L'effetto di tale stimolo porta a proliferazione cellulare, grazie alla forte induzione di IL-2, ed ad acquisizione di funzioni effettrici, ma anche alla prevenzione dell'apoptosi o dell'induzione di anergia che si possono verificare in risposta al solo stimolo antigenico. Non è chiaro se CD28 sia in grado di indurre attivazione di geni diversi da quelli regolati dal TCR, tramite una via del segnale indipendente, o se il suo ruolo sia dedicato esclusivamente all'amplificazione/modulazione del primo segnale.

CTLA-4, a differenza di CD28, è espresso in seguito ad attivazione del linfocita, e per la sua azione inibitoria sono stati proposti diversi meccanismi, tra questi: competizione per i ligandi con CD28 (per i quali ha maggiore affinità), induzione di un signaling negativo (grazie al legame della fosfatasi SHP2), e induzione della disgregazione dei raft lipidici assemblati nella sinapsi immunologica (Walunas et al., 1994; Tivol et al., 1995; Rudd et al., 2003).

Infine, sono stati recentemente proposti, un meccanismo d'inibizione indipendente dall'interazione col ligando, e l'induzione di segnali negativi nelle APC tramite i recettori B7 (*reverse signaling*) (Grohmann et al., 2002; Fallarino et al., 2003; Munn et al., 2004)

H4/ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia del CD28. È espresso in seguito all'attivazione linfocitaria da linfociti CD8⁺ e CD4⁺, come CTLA-4, ed intensifica tutte le risposte basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di citochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula. L'interazione di ICOS con B7h gioca inoltre un ruolo importante nella cooperazione linfociti B/linfociti T [Rudd et al., 2003].

PD-1 e BTLA sono gli ultimi membri della famiglia del CD28 ad essere stati caratterizzati; questi mostrano una forte omologia di sequenza tra loro, e sono localizzati nei cromosomi 2q37 e 3q13 rispettivamente.

PD-1 (*Programmed Death Gene-1*) è un recettore monomero, e come CTLA-4, inibisce la proliferazione mediata dall'attivazione del TCR nei linfociti T e la produzione di citochine; è espresso da linfociti T helper e citotossici, da linfociti B, da monociti attivati, ed a bassi livelli da NKT. Lega due recettori appartenenti alla famiglia di B7, PD-L1 (B7-H1), espresso da cellule della linea ematopoietica e non, e PD-L2 (B7-DC), espresso soltanto da macrofagi e DCs. La funzione inibitoria nei linfociti T avviene in seguito al reclutamento delle fosfatasi SHP1 e SHP2 tramite il motivo ITSM (*immunoreceptor tyrosinebased switch motif*) [Ishida et al., 1992; Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001; Tseng et al., 2001; Vibhakar et al., 1997; Zhang et al., 2004; Shlapatska et al., 2001]

BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*), anch'esso monomero, è espresso in seguito ad attivazione dai linfociti T, e da linfociti B quiescenti o attivati. Il meccanismo dell'inibizione mediata da BTLA, è probabilmente da attribuirsi, come per PD-1, al reclutamento delle fosfatasi SHP1 e SHP2. Il ligando per questo recettore non è ancora noto [Watanabe et al., 2003; Gavrieli et al., 2003] (figura 1).

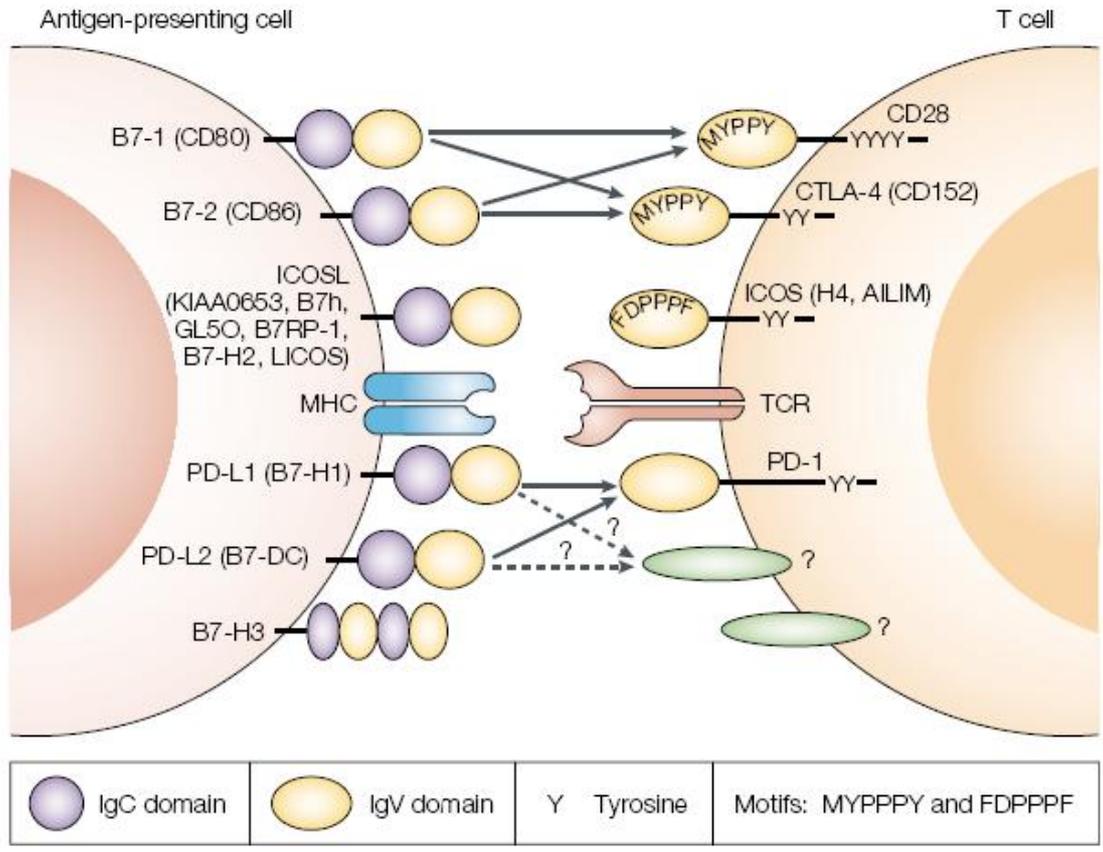


Figura 1 Rappresentazione schematica delle famiglie B7 e CD28; (da Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-26.).

1.2.2 La molecola costimolatoria H4/ICOS

H4 è stata inizialmente identificata nel nostro laboratorio sia nel topo sia nell'uomo [Redoglia V. et al., 1996; Buonfiglio D. et al., 1999]. Kroczek e coll. hanno successivamente descritto il clonaggio nell'uomo di una nuova molecola costimolatoria, denominata ICOS (*inducible T cell costimulator*), espressa selettivamente da linfociti T

attivati [Hutloff A. et al., 1999]. Nel nostro laboratorio è stato successivamente dimostrato che H4 ed ICOS sono la stessa molecola [Buonfiglio D. et al., 2000].

Cellule ICOS positive sono presenti negli organi linfoidi secondari, dove interagiscono con le cellule dendritiche e i linfociti B, nonché nel sangue periferico in seguito all'attivazione.

ICOS mappa nella regione cromosomica 2q33, come CD28 e CTLA-4 (Fig. 2).

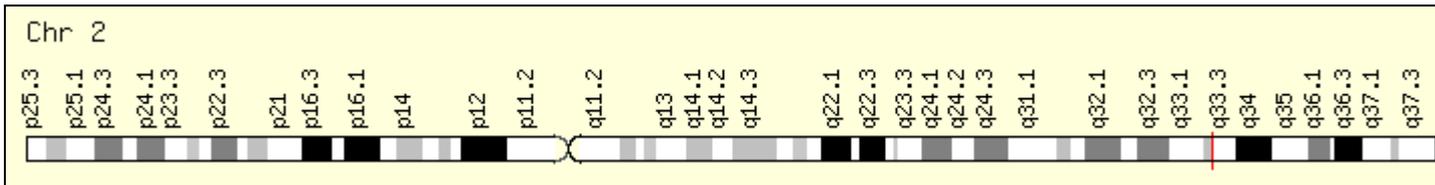


Figura 2 Localizzazione cromosomica di H4/ICOS

La sequenza aminoacidica di ICOS mostra il 24% di somiglianza e il 39% di identità con CD28; sulla base dell'omologia di sequenza è stato proposto che ICOS rappresenti un terzo membro della famiglia molecolare di CD28, insieme a CD28 stesso ed a CTLA-4. A differenza di CD28, che è espresso costitutivamente sulla superficie dei linfociti T, ICOS viene espresso solo in seguito all'attivazione linfocitaria. La molecola è già espressa 24 ore dopo l'attivazione, tuttavia il picco di espressione viene raggiunto dopo 6 giorni; successivamente l'espressione della molecola si riduce gradualmente.

Pur appartenendo alla stessa famiglia, CD28 e ICOS si differenziano in alcuni importanti aspetti. Entrambe inducono la sintesi di citochine (IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α), ma soltanto CD28 induce forte secrezione di IL-2 [Hutloff A. et al., 1999; Yoshinaga S.K. et al., 1999]. Inoltre ICOS non lega i ligandi di CD28 e CTLA-4, B7-1 (CD80), e B7-2 (CD86), ma lega una nuova molecola chiamata B7-h (detta anche B7R-P1 o GL50), espressa costitutivamente da macrofagi, linfociti B e cellule dendritiche [Ling V. et al., 2000].

ICOS è una molecola transmembrana di tipo I, ed è espressa in forma di monomero o di omodimero; è costituita da 199 amminoacidi e la forma dimerica è probabilmente data da legami disolfuro tra residui di cisteina nella regione extracellulare in posizione membrano-prossimale; la forma dimerica ICOS ha un peso molecolare apparente di 55-60 kDa, mentre le singole catene di 27-29 kDa. Ogni catena ha una coda citoplasmatica di 35 amminoacidi, una regione transmembrana di 23 amminoacidi, ed una regione extracellulare di 141 amminoacidi con un singolo dominio immunoglobulinico stabilizzato da due cisteine conservate in posizione 42 e 109 [Coyle J. et al., 2000].

H4/ICOS intensifica tutte le risposte basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di linfochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula.

1.3 La sinapsi immunologica

E' stato proposto un modello di costimolazione, che prevede la formazione di una "sinapsi immunologica", o "SMAC" (*supramolecular activation cluster*), a livello del punto di contatto tra APC e cellula T. Secondo questa teoria l'attivazione del linfocita comporta l'innescamento di un processo dinamico di reclutamento di complessi recettoriali verso lo SMAC [Dustin M.L. et al., 1999]. Questo modello pone l'accento sull'esistenza di aree differenziate della membrana plasmatica, dette raft lipidici o GEMs (*glycosphingolipid-enriched microdomains*), che sono fortemente rappresentate nello SMAC.

I raft lipidici sono microdomini dispersi nel mosaico fluido dei glicerofosfolipidi di membrana, e sono arricchiti in colesterolo, glicosfingolipidi e glicoproteine leganti GPI.

Le caratteristiche stesse dei raft lipidici, cioè la componente glicolipidica e la presenza di colesterolo, portano alla formazione di regioni di aumentata rigidità di membrana che, durante l'attivazione linfocitaria contribuiscono a mantenere il TCR impegnato nel legame con le molecole MHC. Dati sperimentali hanno dimostrato che i raft lipidici sono ricchi di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (LAT, PAG e PTK della famiglia Src), e che il TCR ne entra a far parte durante l'attivazione.

Secondo questo modello la struttura simil-sinaptica formatasi creerebbe una sorta di filtro molecolare capace di selezionare, in base alle dimensioni, le molecole coinvolte nel contatto cellula T/APC. Questo tipo di selezione fisica permetterebbe la regolazione dell'attivazione linfocitaria attraverso la modulazione delle componenti della zolla recettoriale.

Nel centro della sinapsi si accumulano il TCR, Lck, Fyn e PKC θ , mentre nella zona periferica della sinapsi si accumulano LFA-1, CD4, CD28, CD45.

La costimolazione ha dunque luogo in un'area definita della membrana, in cui si ha un aumento della concentrazione locale di molecole coinvolte nelle interazioni cellula-cellula e di trasduttori di segnali citoplasmatici [Xavier R. et al., 1999].

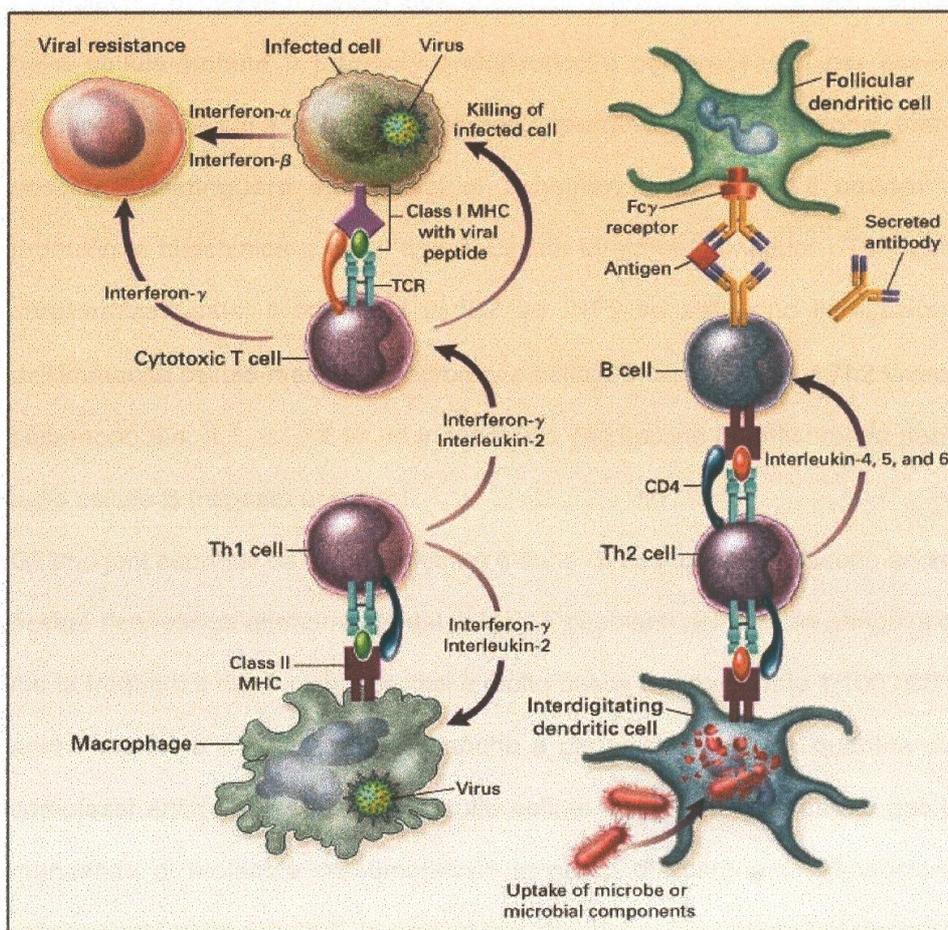
Recentemente è stato dimostrato che la costimolazione mediata da CD28 può innescare la riorganizzazione dei rafts in corrispondenza del punto di contatto tra APC e cellula T. E' stato inoltre proposto un meccanismo per spiegare il ruolo di CD28 nel rinforzare lo stimolo dato dal complesso peptide-MHC al linfocita.

Secondo questo modello l'ingaggio di CD28, consente l'iniziale adesione tra APC e linfocita e, contemporaneamente, attiva una via di trasduzione in grado di indurre la riorganizzazione dell'actina citoscheletrica. La connessione dei raft lipidici al citoscheletro potrebbe spiegare la riorganizzazione dei microdomini di membrana mediata da CD28. La riorganizzazione dei rafts, e delle molecole associate, indurrebbe un'interazione più stabile tra TCR e complesso peptide-MHC all'interno della sinapsi immunologica [Viola A. et al, 1999]. Mentre la visione convenzionale prevede che ogni tipo di recettore generi un suo distinto segnale e che i singoli segnali siano poi armonizzati nel nucleo per regolare la trascrizione, il nuovo modello ipotizza che la sinapsi immunitaria moduli ed amplifichi il segnale trasdotto tramite il TCR agendo a monte rispetto al nucleo.

2. Le cellule presentanti l'antigene (APC)

L'attivazione dei linfociti T richiede che l'antigene venga loro presentato da cellule specializzate dette APC, quali cellule dendritiche (DC), macrofagi e linfociti B. Tali cellule sono in grado di internalizzare, processare e presentare gli antigeni ai linfociti T antigene-specifici inducendone l'attivazione e l'espansione clonale [Delves et al., 2000]. Le DC sono efficienti stimolatrici sia dei linfociti B che T. I linfociti B sono in grado di riconoscere anche autonomamente l'antigene nella sua completezza, i linfociti T invece necessitano che questo venga prima processato sotto forma di peptidi e poi presentati dall'APC in associazione

linfocita è (fig.3).



(MHC). Il
dalla APC

Figura 3 Schematizzazione delle risposte immunitarie cellulo-mediata ed umorale e dell'interazione delle APC con i linfociti T.

2.1 I macrofagi

Il sistema delle cellule mononucleate fagocitiche è costituito dai monociti circolanti nel sangue e dai macrofagi tissutali. Nel corso dell'emopoiesi midollare i progenitori granulocito-macrofagici si differenziano in promonociti che lasciano il midollo ed entrano nel sangue, dove si differenziano ulteriormente, diventando monociti maturi (Fig 4). Questi rimangono in circolo per 8 ore, nel corso delle quali aumentano di volume: successivamente migrano nei tessuti, dove si trasformano nei vari tipi di macrofagi tissutali. Il differenziamento del monocita in macrofago comporta vari cambiamenti nella cellula: il volume aumenta di 5-10 volte, gli organelli citoplasmatici aumentano di numero e di complessità, aumenta l'attività fagocitaria e la produzione di enzimi litici, inizia la secrezione di vari fattori solubili.

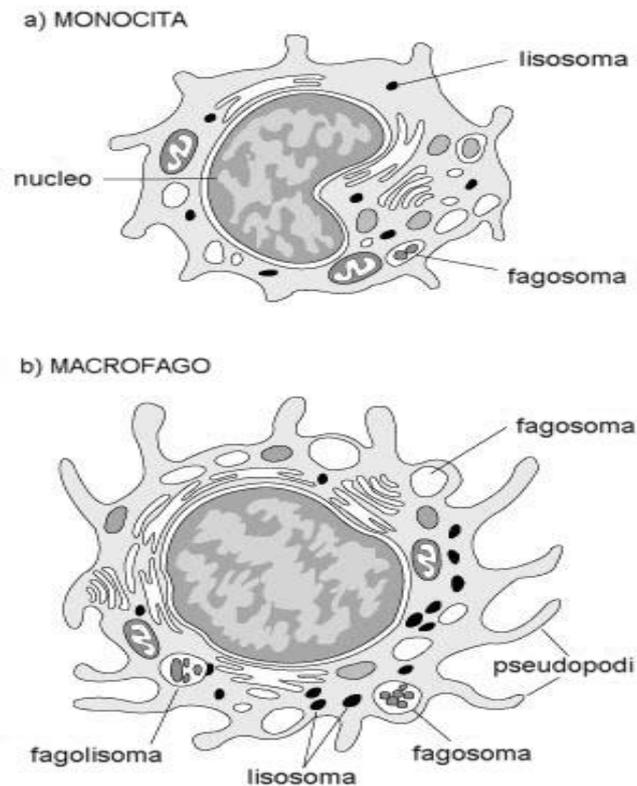


Figura 4 Differenziamento di monociti in macrofagi

I macrofagi sono distribuiti in tutti i distretti dell'organismo: alcuni conservano la capacità di migrare con movimenti ameboidi e sono detti macrofagi liberi, altri invece si stabilizzano in un particolare tessuto e vengono pertanto detti stabili. Questi ultimi esercitano funzioni specializzate nei vari tessuti e prendono nomi diversi a seconda della sede in cui si trovano:

- Macrofagi alveolari nel polmone
- Istiociti nei tessuti connettivi
- Cellule di Kupffer nel fegato
- Cellule mesangiali nel rene
- Cellule microgliali nel cervello

- Osteoclasti nel tessuto osseo

I macrofagi sono normalmente in stato di quiescenza ma, nel corso della risposta immunitaria, possono essere attivati da vari stimoli. In particolare la fagocitosi di un antigene particellare (microorganismi, particelle insolubili, cellule autologhe danneggiate o morte, detriti cellulari, fattori attivati della coagulazione) funziona da stimolo iniziale, ma lo stato di attivazione può essere ulteriormente potenziato da citochine secrete dai linfociti T_H (il più potente attivatore è IFN- γ), da mediatori della risposta infiammatoria e da prodotti della parete cellulare batterica (LPS).

I macrofagi attivati hanno un'aumentata attività fagocitica e microbica, secernono una maggior quantità di mediatori dell'infiammazione, esprimono livelli più elevati di molecole MHC di classe II e hanno una maggior capacità di attivare i linfociti T. Inoltre secernono proteine con attività citotossica, che concorrono all'eliminazione di un gran numero di patogeni, incluse cellule infettate da virus, cellule neoplastiche e batteri intracellulari.

Le due funzioni principali dei macrofagi sono quindi la degradazione degli antigeni e la loro presentazione alle cellule della risposta immunitaria specifica.

Generalmente durante la risposta immunitaria i macrofagi sono attratti da svariate sostanze e muovono verso di esse in un processo detto chemiotassi: quando entrano in contatto con l'antigene emettono pseudopodi in grado di catturarlo e di inglobarlo in un fagosoma. All'interno della cellula il fagosoma si fonde con un lisosoma che grazie ai suoi enzimi (lisozima ed enzimi idrolitici) è in grado di digerire e processare l'antigene stesso.

Inoltre il macrofago è in grado di produrre numerose sostanze ad attività antimicrobica e citotossica: la maggior parte di questi mediatori sono forme reattive dell'ossigeno o dell'azoto (ROS o *reactive oxygen species* e RNI o *reactive nitrogen species*). Il processo di produzione di questi mediatori durante la fagocitosi è noto come *burst* respiratorio e implica l'attivazione di una ossidasi di membrana che catalizza la riduzione dell'ossigeno ad anione superossido, che a sua volta genera altri potenti agenti ossidanti, quali il radicale idrossilico e il perossido di idrogeno. Nel fagolisosoma inoltre la mieloperossidasi agisce sul perossido di idrogeno per produrre agenti ossidanti più potenti e durevoli tra cui l'ipoclorito. I macrofagi attivati con LPS invece, in presenza di IFN- γ , aumentano l'espressione di ossido-nitrico sintetasi (NOS), che produce ossido nitrico: quest'ultimo può agire come tale oppure reagire con i ROS per formare specie ancora più tossiche.

Altre sostanze ad attività antimicrobica e citotossica sono le defensine, peptidi cationici di 29-35 aminoacidi, ricchi di residui cisteinici, in grado di formare dei canali permeabili agli ioni nella membrana cellulare dei patogeni.

L'antigene fagocitato viene quindi degradato in peptidi che si associano a molecole MHC di classe II: questi complessi sono trasportati sulla membrana dei macrofagi. Questo meccanismo viene chiamato presentazione dell'antigene e ha la funzione di attivare i linfociti T_H. I macrofagi collaborano all'attivazione della risposta infiammatoria anche tramite secrezione di fattori solubili quali citochine (IL-1, TNF- α , IL-6), proteine sieriche del complemento, enzimi idrolitici [Goldsby R.A. et al., 2000].

2.2 I linfociti B RIF BIBLIO!!!!

I linfociti B esprimono sulla loro superficie un recettore immunoglobulinico (BCR, *B cell receptor*) attraverso il quale legano e internalizzano in modo specifico antigeni estranei. Il legame dell'antigene alle immunoglobuline (Ig) di membrana induce l'espressione delle molecole costimolatorie CD80, CD86 e B7h, fondamentali per l'interazione con i linfociti T helper in qualità di APC. I T helper, ricevuto il doppio segnale mediato dal complesso MHC-peptide e dalle molecole costimolatorie, si differenziano in cellule effettrici e a loro volta promuovono la proliferazione dei linfociti B stessi e il loro differenziamento in plasmacellule secernenti anticorpi [Evans ED. et al., 2000].

La maturazione dei linfociti B a partire dai loro precursori avviene nel fegato fetale e, dopo la nascita, nel midollo osseo. Lo sviluppo dei linfociti B è strettamente dipendente dalle cellule stromali del midollo osseo; infatti le cellule staminali isolate dal midollo e poste in un terreno di coltura non danno luogo alla differenziazione in linfociti B. Le cellule stromali midollari agiscono in primo luogo grazie a molecole di adesione e rispettivi ligandi tra queste stesse cellule e i linfociti B; in secondo luogo secernono fattori di crescita che stimolano la differenziazione e proliferazione linfocitaria (IL-7, SDF-1, SCF). La maturazione dei linfociti B è caratterizzata dalla migrazione delle future cellule B mature dalla periferia verso le zone più centrali del midollo osseo e dalla contemporanea adesione meno stretta con le cellule stromali. Le ultime fasi della maturazione, infine, si svolgono negli organi linfoidi periferici come la milza.

2.2.1 Stadi dello sviluppo dei linfociti B

- Linfociti pro-B:** derivano dalla cellula staminale pluripotente ematopoietica e sono distinguibili dalle altre cellule immature per l'espressione di molecole di superficie ristrette allo stipite B (CD19 e CD10). Caratteristica è la presenza nel citoplasma dell'enzima TdT (deossinucleotidil transferasi terminale): si tratta di un enzima caratteristico di tutti i linfociti immaturi, sia T che B, che partecipa al processo di

rimaneggiamento dei geni delle immunoglobuline e del TCR. Nei cosiddetti **linfociti pro-B precoci** si ha un riarrangiamento del *locus* della catena pesante che porta al congiungimento dei segmenti D con uno dei segmenti J, accompagnato dalla delezione del tratto di DNA interposto; successivamente nei **linfociti pro-B tardivi** uno dei segmenti genici V_H si collega al complesso DJ_H (ricombinazione V(D)J) (figura 5).

- Linfociti pre-B:** contengono nel loro citoplasma catene pesanti μ libere. Una piccola percentuale delle catene citoplasmatiche μ vengono espresse sulla superficie cellulare in associazione con una catena leggera sostitutiva non polimorfica, diversa dalle catene $L \kappa$ e λ , formando i recettori pre-B, l'espressione dei quali è necessaria per stimolare la proliferazione e far proseguire la maturazione dei linfociti B.

- Linfociti B immaturi:** si ha la produzione di una catena leggera κ o λ ; questa si associa alla catena pesante μ formando IgM monomeriche, le quali vengono espresse sulla membrana cellulare, dove svolgono la funzione di recettore antigenico. Queste cellule non possiedono più catene μ citoplasmatiche e perdono la positività per la TdT.

Gli stadi finora descritti avvengono nel midollo osseo e sono antigene-indipendenti. Le cellule B immature sono più facilmente modulabili delle mature, non proliferano né si differenziano in risposta all'antigene; al contrario l'incontro con un antigene porta alla loro morte per apoptosi o alla inattivazione funzionale. Questo fenomeno viene definito selezione negativa dei linfociti ed è fondamentale nell'induzione della tolleranza al *self*. Inoltre trattando con anticorpi (Ab, *antibodies*) anti-IgM i linfociti immaturi, le IgM di membrana vengono internalizzate e la loro scomparsa non è seguita da risintesi, come invece avviene nei B maturi.

- Linfociti B maturi vergini (*naive*):** sono caratterizzati dalla coespressione di IgM e IgD sulla superficie cellulare, oltre ai recettori C3 per il complemento, FcR per le Ig, e di antigeni MHC di seconda classe. Su ogni cellula entrambi gli isotipi anticorpali espressi sono dotati di una medesima regione V ed hanno pertanto un'identica specificità antigenica.

2.2.2 Generazione della diversità idiotipica

Il sistema immunitario umano è in grado di produrre circa 10^{11} immunoglobuline con diversa specificità (repertorio anticorpale). Prima di poter esaminare direttamente la

sequenza genica delle immunoglobuline, erano state formulate alcune ipotesi sull'origine della diversità:

A. Teoria dei geni multipli (*germline hypothesis*): un organismo eredita tutti i geni necessari per la sintesi di 10^{11} Ig, un gene per ciascuna proteina. Ovviamente se fosse vera questa ipotesi si verificherebbe un enorme spreco di genoma.

B. Teoria della mutazione somatica (*somatic diversification theories*): esiste un limitato numero di geni nella linea germinale che mutano durante l'ontogenesi, nel corso delle successive divisioni cellulari, producendo numerosi geni diversi, espansi successivamente nei cloni di linfociti B. Questa teoria prevede un risparmio di materiale genetico rispetto alla precedente.

C. Teoria della ricombinazione somatica (*somatic recombination theories*): questa teoria fu postulata in seguito alle precedenti, nel 1965, da Dryer e Bennet i quali ipotizzavano l'esistenza di due geni per ogni catena polipeptidica anticorpale, uno per la parte V ed uno per la C, per un numero totale di 16 geni C e 10^8 geni V. Nella linea germinale esisterebbe 1 gene per ciascuna sottoclasse di parte costante e n geni V. I geni V e C sarebbero separati fra loro nel genoma nella linea germinale, ma durante la differenziazione uno dei molteplici geni V verrebbe avvicinato e legato ad un gene C (ricombinazione) per formare il gene completo capace di codificare per una catena di Ig completa.

Questa teoria, che appariva rivoluzionaria in quanto sconvolgeva la vecchia legge della genetica "un gene-una proteina", fu subito bene accolta ed elegantemente dimostrata alcuni anni dopo da Tonegawa (ciò gli valse il premio Nobel nel 1986). Susumu Tonegawa poté dimostrare la validità dell'ipotesi di Dryer e Bennet in quanto la tecnologia del DNA ricombinante, perfezionatasi in quegli anni, gli consentì di arrivare ad un'analisi diretta dei geni delle Ig. In particolare Tonegawa, tramite la metodologia del Southern Blot, dimostrò che le dimensioni dei frammenti di DNA che contengono i geni delle Ig sono diverse in cellule che producono o non producono anticorpi.

2.2.3 Organizzazione dei geni delle immunoglobuline

I geni per le immunoglobuline sono organizzati in tre *loci* separati: uno per la catena leggera κ , uno per la catena leggera λ , e uno per tutte le catene pesanti. Il *locus* per la catena λ è localizzato sul cromosoma 22, ed è composto da tre diversi segmenti genici, denominati V, J e C. Il *locus* per la catena κ è posto sul cromosoma 2 e differisce da quello dell'altra catena leggera perché contiene un solo segmento genico C, mentre esistono

quattro segmenti genici C per la λ . Nel *locus* delle catene pesanti, posto sul cromosoma 14, tra i segmenti genici V e J ci sono una serie di segmenti D, che aumentano ulteriormente la variabilità; inoltre il segmento C è composto da 9 regioni, una per ciascuna isotipo. Una sequenza nucleotidica altamente conservata si trova all'estremità 5' di ciascun esone della regione variabile V; questa codifica per 20-30 aminoacidi N-terminali moderatamente idrofobici che servono da segnale per il trasferimento nel lume del reticolo endoplasmatico della catena polipeptidica tradotta a livello ribosomiale (*peptide leader*).

2.2.4 Ricombinazione V(D)J

Durante la maturazione dei linfociti B i segmenti genici delle Ig vanno incontro ad un processo di ricombinazione somatica del DNA secondo un ordine ben preciso.

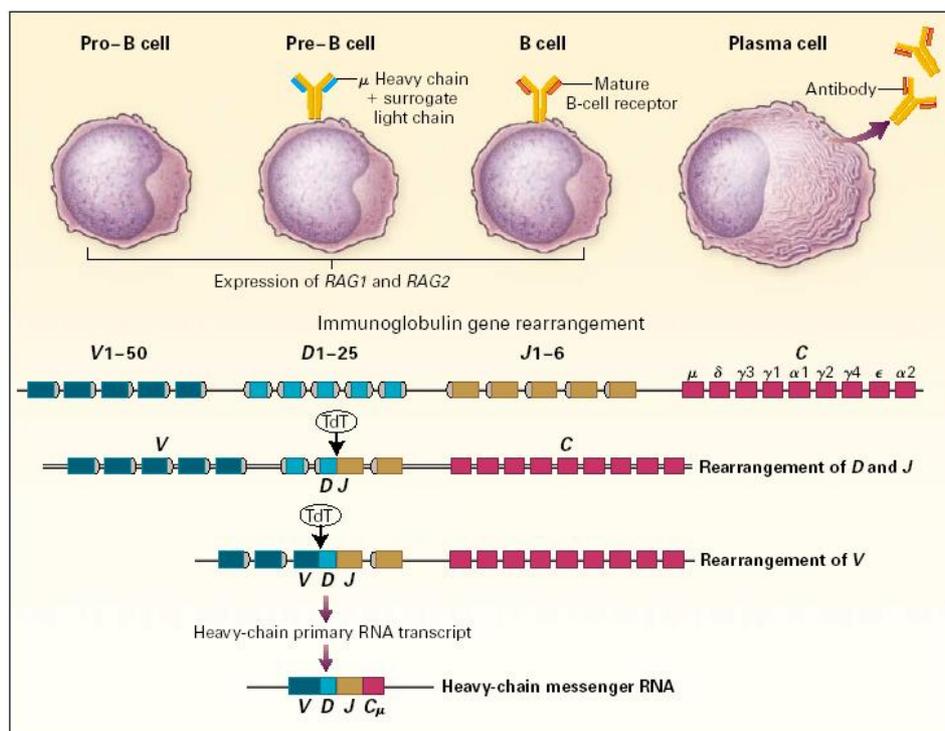


Figura 5 Riarrangiamento genico delle Immunoglobuline [Delves et al., review, 2000, The immune system]

Nel **linfocita pro-B precoce** si ha la prima ricombinazione che porta al congiungimento di uno dei segmenti D con uno dei segmenti J, con la contemporanea delezione del tratto di DNA interposto. Nel **linfocita pro-B tardivo** uno dei segmenti genici V si congiunge al complesso DJ precedentemente formato. Il gene riarrangiato V(D)J è separato dalla regione C dal tratto di DNA che contiene i geni J più distali. Tutto questo tratto di DNA viene trascritto in un pre-mRNA o RNA primario-immaturo: la successiva processazione porta all'eliminazione mediante *splicing* delle sequenze di RNA intervallate tra il complesso VDJ e il gene C_μ. In posizione 3' rispetto all'RNA di ciascuna C_H vi sono dei siti di poliadenilazione (uno per le μ, uno per le δ e così per le altre classi) e in solo uno di questi, in base all'isotipo che deve essere espresso, vengono aggiunti numerosi nucleotidi di adenina, chiamati "code di poli-A" che guidano lo *splicing*; così, ad esempio, se viene poliadenilato il sito in 3' rispetto alla C_ε viene espressa la IgE e il tratto di RNA tra il complesso VDJ e il C_ε viene eliminato grazie allo *splicing*.

La traduzione dell'mRNA maturo porta alla produzione di una catena μ funzionante (nello stadio del linfocita pre-B): questa fa sì che non si attui il riarrangiamento del *locus* della catena pesante sull'altro cromosoma; tale fenomeno prende il nome di esclusione allelica. Se tuttavia per qualsiasi motivo non si produce una catena pesante funzionante, si attua il riarrangiamento sull'altro allele; infine se anche questo porta ad una catena pesante abortiva, si ha la morte della cellula per apoptosi, evento tutt'altro che raro.

La ricombinazione del DNA nei loci κ e λ comincia solamente dopo la ricombinazione e l'espressione dei geni della catena pesante μ. Lo schema seguito è sostanzialmente lo stesso con piccole variazioni. Mancando il segmento D l'assemblaggio riguarda esclusivamente uno dei segmenti V con uno dei segmenti J, con formazione di un complesso VJ. Questo, come nelle catene pesanti, è separato dal segmento C da un introne che viene trascritto nell'mRNA immaturo e deletato mediante *splicing* nella maturazione. Il *locus* κ si riarrangia per primo e la produzione di una catena κ blocca il riarrangiamento a livello del *locus* λ. Ogni linfocita B produce solo un tipo di catena leggera (esclusione isotipica) e, come avviene per le catene pesanti, la produzione di una catena leggera su uno dei due alleli blocca il riarrangiamento nell'altro (esclusione allelica).

Il riarrangiamento del DNA è mediato dall'attività coordinata di numerosi enzimi, alcuni dei quali espressi esclusivamente nei linfomi, altri presenti in tutte le linee cellulari. Nell'insieme questi enzimi sono detti "ricombinasi V(D)J". Il prodotto di due geni chiamati RAG1 e RAG2 (*Recombination Activating Gene*) sono la componente enzimatica

specificatamente espressa nei linfociti immaturi. Questi enzimi riconoscono particolari sequenze di DNA, chiamate sequenze di riconoscimento della ricombinazione, che precedono (lato 3') ogni segmento V, seguono ogni segmento J (lato 5') e sono ad entrambi i lati di ogni segmento D. Le sequenze di riconoscimento consistono in una sequenza altamente conservata di sette nucleotidi – eptamero – seguita da una sequenza non conservata di 12 o 23 nucleotidi – *spacer* – seguita a sua volta da un'altra sequenza altamente conservata – nonamero. Lo *spacer* può variare come tipo di nucleotidi, ma la sua lunghezza rimane sempre uguale e corrisponde a uno o due giri di elica del DNA. La sua funzione è probabilmente quella di permettere l'appaiamento di queste sequenze segnale omologhe e complementari (eptameri e nonameri) con successiva formazione di una struttura a stelo e avvicinamento dei segmenti genici. L'estroflessione del DNA con questa struttura a stelo lo rende accessibile all'azione della ricombinasi che taglia alla base della forcina e poi congiunge le due estremità dei segmenti genici. Prima che i due segmenti si colleghino, si attua la rimozione o l'aggiunta di alcuni nucleotidi, questo aumenta la variabilità della ricombinazione (diversità giunzionale). La delezione di qualche nucleotide si verifica grazie all'azione di una nucleasi, mentre l'aggiunta di nuove sequenze nucleotidiche è mediata dall'enzima transferasi deossiribonucleotidica terminale (TdT).

Nella ricombinazione è generalmente seguita la cosiddetta "regola del 12/23", ossia si ricombinano tra loro due segmenti genici, solo se uno ha uno *spacer* di 12 nucleotidi e l'altro di 23 nucleotidi. Questo è importante perché spiega la sequenza nella ricombinazione delle catene pesanti: ciascun segmento V_H e J_H ha uno *spacer* di 23 nucleotidi e non può quindi essere ricombinato; prima è necessaria la ricombinazione tra il segmento D (fiancheggiato da entrambi i lati da uno *spacer* di 12 nucleotidi) con un segmento J e successivamente il complesso DJ può ricombinarsi con il segmento V.

Il repertorio delle Ig consta di circa 10^{11} anticorpi con specificità differente; tre meccanismi fondamentali sono alla base della variabilità idiotipica:

- 1- Diversità combinatoria: ci sono molte copie dei segmenti genici V, D, J. Il massimo numero di combinazioni possibili per ogni *locus* è dato dal prodotto del numero dei segmenti V, J e D (se presenti). Così per la catena leggera κ , ci sono circa 40 segmenti genici V e 5 segmenti J e le possibili ricombinazione saranno pertanto 200 (40×5). Per la catena leggera λ ci sono circa 30 segmenti genici V e 4 J con 120 combinazioni. In tutto, per quanto riguarda le catene leggere si possono ottenere 320 diverse combinazioni. Per quanto riguarda le catene pesanti abbiamo

65 segmenti genici funzionali V, 27 D e 6 J con 11.000 possibili differenti combinazioni. Ogni possibile catena pesante prodotta si può legare con ogni possibile catena leggera e questo permette di aumentare ulteriormente la diversità combinatoria della regione variabile delle Ig: $320 \times 11.000 = 3,5 \times 10^6$. In realtà però il grado di diversità combinatoria che si può generare è molto minore, rispetto a questo massimo teoricamente atteso, perché non tutte le possibili combinazioni danno origine ad Ig funzionali e non tutti i segmenti genici sono scelti con uguale frequenza.

- 2- Diversità giunzionale: durante il riarrangiamento genico, nel momento dell'unione dei segmenti genici V, (D), e J si possono verificare degli "errori", ad esempio possono essere intrappolate basi dell'introne, oppure l'unione tra V e J avviene con lo scarto di qualche base. Questo fenomeno di "saldatura imprecisa" viene anche denominato "flessibilità della ricombinazione" ed aumenta la variabilità della catena prodotta. Inoltre, come già accennato alcune nucleasi possono eliminare dei nucleotidi, mentre l'enzima TdT ne può aggiungere di nuovi (nucleotidi N); un ulteriore contributo è dato dello stesso complesso enzimatico RAG, che nel momento in cui taglia la forcina di DNA e ripara il DNA interrotto, può aggiungere delle sequenze di nucleotidi palindromiche (nucleotidi P).
- 3- Ipermutazione somatica: i meccanismi che generano il repertorio di Ig fin qui descritti avvengono durante la maturazione delle cellule B all'interno del midollo osseo; esiste tuttavia un ulteriore processo che si verifica nei linfociti maturi all'interno degli organi linfoidi periferici, conosciuto come ipermutazione somatica. Questo consiste nella generazione di mutazioni puntiformi in quelle particolari regioni dei geni V, che determinano la complementarità. Alcune di queste mutazioni fanno sì che l'anticorpo generato abbia una migliore affinità per l'antigene: i linfociti B che secernono queste Ig vengono selezionati positivamente. Questo fenomeno è noto come maturazione dell'affinità e si verifica solo nel corso delle risposte anticorpali ad antigeni proteici, dipendenti dalla cooperazione dei linfociti T helper.

2.2.5 Attivazione linfocitaria e risposta umorale

Il recettore per l'Ag dei linfociti B (*BCR: B-cell receptor*) è costituito da una Ig di superficie, con la stessa specificità antigenica delle Ig eventualmente secrete, in associazione ad un eterodimero di molecole non polimorfe, $Ig\alpha$ ed $Ig\beta$, che contengono nella loro coda

citoplasmatica sequenze ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) in grado di mediare la funzione di trasduzione del segnale.

Il *cross-linking* delle Ig di membrana determina l'attivazione del linfocita mediante l'avvicinamento tra loro di numerose copie di ITAM, con conseguente innesco della cascata di trasmissione del segnale. Il meccanismo di trasmissione del segnale attivante dalla superficie cellulare al nucleo è indubbiamente molto complesso e in parte sconosciuto. Probabilmente esistono meccanismi ridondanti, che si intersecano nella loro azione: ingresso di Ca^{++} , diacilglicerolo, proteinochinasi, etc. Il meccanismo più chiaro è quello delle tirosinchinasi: i primi fenomeni che diventano evidenti nei linfociti B dopo il *cross-linking* del BCR sono costituiti dalla comparsa di residui tirosinici fosforilati su una serie di proteine citoplasmatiche e di membrana. La fosforilazione dei residui tirosinici nella coda citoplasmatica di una proteina di membrana porta al legame alla coda stessa di altre proteine che contengono specifici siti di legame per tirosin-fosfato. Si vengono a costituire in questo modo nel citoplasma dei complessi molecolari dotati di attività enzimatica che con diverse modalità trasmettono il messaggio di attivazione alle DNA-polimerasi nucleari.

Il segnale trasmesso dal BCR è amplificato dal legame del cosiddetto complesso co-recettoriale dei linfociti B con i rispettivi ligandi. Il co-recettore dei linfociti B è formato da tre molecole di superficie: CD19, CD21(o CR2) e CD81. La molecola CD21 (il recettore per il complemento CR2) ha come ligando il frammento C3b del complemento: in questo modo gli antigeni che attivano il complemento possono portare ad un *cross-linking* del BCR con il co-recettore con conseguente potenziamento delle vie di trasduzione del segnale.

Il BCR ha due ruoli nell'attivazione dei linfociti B: trasmette il segnale all'interno della cellula una volta che è avvenuto il legame con l'antigene e internalizza l'antigene in vescicole endocitotiche in cui viene processato per poi essere ripresentato in superficie legato a molecole MHC di II classe.

L'attivazione dei linfociti B richiede da una parte un antigene polimerico che innesca il *cross-linking* dei BCR, dall'altra un secondo segnale di rinforzo dato dalla frazione del complemento C3b che si lega al co-recettore. Tuttavia i linfociti B maturi vergini sono difficili da attivare con il solo legame dell'antigene e del complemento, richiedono un'ulteriore segnale di co-stimolazione. Questo segnale è dato dall'azione dei linfociti T *helper* o, raramente, direttamente da alcuni costituenti batterici come il lipopolisaccaride.

In base al segnale possiamo dividere la risposta umorale dei linfociti B in due tipi fondamentali:

- **Risposta umorale timo-dipendente (o TD):** si attua verso antigeni proteici (antigeni TD) incapaci di indurre una risposta anticorpale in assenza della cooperazione delle cellule T *helper*. A queste risposte altamente specializzate consegue la generazione di Ab di isotipo diverso, la generazione di linfociti B memoria e la contemporanea maturazione dell'affinità.
- **Risposta umorale timo-indipendente (o TI):** si attua verso particolari antigeni (antigeni TI), come polisaccaridi, glicolipidi, acidi nucleici, proteine polimeriche, in grado di indurre una produzione di anticorpi anche in animali o uomini deficitari di linfociti T. Questi antigeni sono ulteriormente suddivisibili in due classi in base a due differenti modi di attivare i linfociti B.
 - Gli **antigeni TI-1**, il cui prototipo è rappresentato dal lipopolisaccaride batterico (LPS), a basse concentrazioni si comportano come antigeni TD, mentre ad alte concentrazioni si comportano come attivatori policlonali. Il meccanismo responsabile dell'attivazione diretta dei linfociti da parte del LPS è sconosciuto.
 - Gli **antigeni TI-2**, come il polisaccaride microbico, sono molecole polivalenti, composte da molteplici epitopi antigenici uguali tra loro, che agiscono mediante un esteso *cross-linking* dei BCR specifici per l'antigene. Inoltre molti polisaccaridi attivano il complemento che funge da ulteriore segnale di attivazione. Probabilmente la risposta a questi antigeni è data da una sottopopolazione dei linfociti B, ovvero i linfociti B-1, così chiamati in quanto il loro sviluppo precede quello dei comuni linfociti B (talvolta chiamati B-2). Queste cellule rappresentano il 5-10% dei linfociti B, molte esprimono sulla membrana la molecola CD5, hanno una concentrazione di sIgM molto maggiore di sIgD, hanno un repertorio ristretto di geni V e sembrano avere un ruolo nella risposta immunitaria precoce (in analogia ai linfociti T $\gamma\delta$). Particolare importanza sembrano avere dal punto di vista clinico, in quanto tutte le leucemie linfatiche croniche (CLL) originano da queste cellule; inoltre in alcune malattie autoimmuni sembrano clonalmente espansi.

La risposta umorale timo dipendente richiede l'attivazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper ($CD4^+CD8^-$) che rispondono al medesimo antigene (riconoscimento associato). Occorre, quindi, affinché vengano prodotti anticorpi specifici per un determinato patogeno, che un linfocita CD4 specifico sia attivato da una APC (cellula

presentante l'antigene) e interagisca con un linfocita B che ha legato sulle proprie slg il medesimo patogeno. Le due cellule, pur essendo specifiche per lo stesso antigene, tuttavia non riconoscono il medesimo epitopo, infatti le cellule T possono riconoscere epitopi lineari interni ad una determinata molecola, mentre i linfociti B riconoscono epitopi conformazionali presenti sulla superficie della molecola. Un esempio chiarificante è rappresentato dalla risposta immunitaria ad una particella virale: la cellula B riconoscendo un epitopo dell'involucro virale, può internalizzare l'intera particella virale, processarla e quindi esporre sulla propria superficie un peptide interno del virus in associazione all'MHC di II classe. Le cellule T helper, già precedentemente attivate dalle APC presentanti questo epitopo interno del virus, lo riconoscono sulla superficie del linfocita B e possono attivare la cellula B.

La necessità del "riconoscimento associato" è altresì sfruttata nella preparazione dei vaccini per la manipolazione della risposta anticorpale. Nel vaccinare i bambini contro l'*Haemophilus influenzae* si associa il polisaccaride capsulare batterico con il tossoide tetanico verso il quale sono stati già vaccinati in precedenza con successo. In questo modo si sfruttano i linfociti T helper già attivati dal tossoide tetanico che possono, a loro volta, cooperare con i linfociti B naive che riconoscono il polisaccaride dell'*Haemophilus*.

Il riconoscimento associato fu originalmente scoperto tramite gli studi sulla risposta umorale agli *apteni*. Gli *apteni* sono piccoli composti chimici in grado di legarsi alle Ig di superficie e agli Ab in soluzione, ma incapaci di per sé di evocare una risposta immunitaria, in quanto incapaci di portare ad un *cross-linking* dei BCR. Quando gli *apteni* sono coniugati con delle proteine *carrier* diventano immunogeni, poiché la proteina *carrier*, legando molti apteni, è in grado di far associare (*cross-linking*) i BCR. Questo tipo di risposta richiede la presenza di linfociti B specifici per l'aptene e di linfociti T specifici per la proteina *carrier*; è ovvio inoltre che aptene e *carrier* devono essere fisicamente legati. La formazione dei *complessi aptene-carrier* è alla base delle reazioni avverse ad alcuni farmaci come le penicilline.

I linfociti T helper attivati, quando riconoscono sulla superficie dei linfociti B l'appropriato complesso peptide-MHC di II classe, esprimono sulla membrana proteine di legame e secernono citochine che sinergizzano per l'attivazione dei linfociti B. Il principale recettore espresso dai linfociti T appartiene alla famiglia dei TNF ed è conosciuto come "**ligando di CD40**" (o **CD40L** o CD154), perché lega la molecola di superficie dei linfociti B, **CD40**. Il legame del CD40, costituzionalmente espresso dai B, con il CD40L, espresso solo dai T attivati, fa entrare la cellula B nel ciclo cellulare. Inoltre è stato osservato che topi *knockout*

o pazienti privi di CD40 o CD40L presentano solo IgM e non vanno incontro a *switching* isotipico.

Di concerto con questi recettori agiscono le citochine, sempre prodotte dai linfociti T helper attivati, escrete in quella particolare zona della cellula che è a contatto con il linfocita B. Le citochine da un lato amplificano il segnale dei recettori di membrana, dall'altro condizionano lo *switching* isotipico, indirizzandolo verso un particolare isotipo. Nel topo, ad esempio, IL4 induce preferenzialmente lo *switching* verso IgG1 e IgE, mentre TGF- β (*transforming growth factor*) le IgG2 e le IgA.

2.2.5 Lo *switching* isotipico

Gli anticorpi differiscono non solo per la diversità della regione V che lega l'antigene, ma anche per la regione C. Lo scopo dello *switching* isotipico è quello di mantenere la specificità antigenica e contemporaneamente creare anticorpi funzionalmente diversi in base al tipo di risposta che il sistema immunitario deve innescare verso un determinato patogeno. Il principale meccanismo dello scambio di classe, noto come **ricombinazione per scambio**, fa sì che il tratto di DNA interposto tra il complesso V(D)J e il segmento genico C_H interessato venga eliminato. Così se vengono deleti i segmenti genici C μ e C δ , il complesso V(D)J verrà accostato al segmento C γ 3 e la Ig prodotta sarà un'IgG3. La successiva eliminazione degli altri segmenti porterà all'espressione delle diverse classi. Vi sono alcuni linfociti B in grado di sintetizzare più classi di Ig: in questo caso la ricombinazione non riguarda il DNA ma l'RNA. Infatti viene trascritto un mRNA immaturo comprendente molti o tutti i segmenti genici C_H che poi, tramite *splicing* alternativo, viene processato in un mRNA maturo delle diverse classi.

2.2.6 Interazione tra linfocita B e T helper partner

La frequenza di un linfocita B o T dotato di una certa specificità antigenica è molto bassa, pari a 1 su 10.000 o 1 su un 1.000.0000. Cospicue le possibilità di un incontro tra i due linfociti (B e T) specifici per lo stesso antigene sono comprese tra 1 su 10⁸ e 1 su 10¹². La soluzione, come vedremo, sta nella particolare circolazione dei linfociti all'interno degli organi linfoidi secondari e dal convogliamento degli antigeni negli stessi organi.

Quando un antigene è introdotto nell'organismo ospite, è catturato dalle cellule processanti l'antigene (APC) che migrano dal tessuto all'interno delle zone T dei linfonodi drenanti. I linfociti T *naive* circolano in continuazione in questa zona linfonodale e in questo modo le possibilità di un incontro con l'antigene sono molto alte. Una volta

riconosciuto l'antigene i linfociti T attivati sono intrappolati nella zona T mediante particolari molecole di adesione. I linfociti B, a loro volta, entrano nel linfonodo nella zona T attraverso le venule dall'alto endotelio e la attraversano velocemente per raggiungere la zona B (follicolo primario). In questo passaggio si trovano in stretta vicinanza dei linfociti T attivati e, se riconoscono lo stesso antigene, vengono intrappolati. L'interazione tra le due linee cellulari è molto stretta ("*cognate interaction*") e coinvolge non solo l'antigene, ma anche diverse molecole di superficie espresse dai due tipi cellulari (CD40:CD40L; B7-2/B7-1:CD28). I linfociti B vengono attivati tramite questa "*cognate interaction*" e danno luogo ad un *focus* primario di espansione clonale al confine tra zona T e zona B. Dopo diversi giorni il *focus* primario va incontro ad involuzione a causa dell'apoptosi di molti linfociti. Alcune dei linfociti B, tuttavia, sopravvivono, si differenziano in plasmacellule e migrano nella polpa rossa splenica o nei cordoni midollari linfonodali. Altri linfociti migrano all'interno dei follicoli linfoidi primari dove continuano a proliferare e formano i **centri germinativi**. I centri germinativi sono composti da linfociti B in intensa proliferazione e da un 10% di linfociti T con funzione *helper*. I linfociti B in rapida espansione (**centroblasti**) perdono le slg e spingono alla periferia del follicolo la restante popolazione dei linfociti che formano la **zona mantellare**. In seguito qualche linfocita B riduce il tasso di duplicazione e comincia a esprimere elevati livelli di slg per dare origine ai **centrociti**. I centroblasti in un primo momento costituiscono la cosiddetta "*dark zone*" del centro germinativo, così chiamata perché le cellule sono densamente stipate. Col successivo sviluppo si viene a formare la "*light zone*" dove sono molto più rappresentate le cellule follicolari dendritiche (CDF) e molto meno addensati i linfociti.

All'interno dei centri germinativi i linfociti B in replicazione vanno incontro alla **maturazione dell'affinità** mediante **l'ipermutazione somatica**. Questo meccanismo genera mutazioni puntiformi all'interno della regione V delle Ig. È stato calcolato che il tasso di mutazione somatiche nei linfociti B del centro germinativo si aggira attorno ad una mutazione/10³ paia di basi ad ogni divisione cellulare, mentre nelle altre cellule somatiche si verifica una mutazione ogni 10¹⁰ paia di basi. Essendo le regioni V delle catene pesanti e leggere codificate da circa 10000 paia di basi, questo implica che le mutazioni si accumulino ad un tasso di circa una per ogni divisione cellulare. Molte mutazioni hanno un impatto negativo sulla capacità dei linfociti B di legare l'antigene: queste cellule subiscono un processo di morte per apoptosi e sono prontamente fagocitate dai macrofagi. Quando invece queste mutazioni provocano un aumento dell'affinità e della specificità per l'antigene, questi linfociti B sono selezionati positivamente e espansi clonalmente. Le

cellule follicolari dendritiche sembrano giocare un ruolo fondamentale nella selezione positiva o negativa dei linfociti: i linfociti capaci di legarsi ad alta affinità agli antigeni espressi dalle CDF sono indotti alla trasduzione di proteine ad attività anti-apoptotica.

Alcune dei linfociti B dei centri germinativi, sopravvissuti a questo processo di selezione, migrano dalla *dark zone* alla *light zone* dove possono ancora andare incontro a scambio isotipico. Le cellule escono poi dal centro germinativo e si differenziano in plasmablasti, in grado di replicarsi rapidamente e di sintetizzare un alto tasso di Ig. Infine si differenziano in plasmacellule, cellule non divisibili, che migrano nel midollo osseo, dove, grazie alle citochine sintetizzate dalle cellule stromali midollari, sopravvivono per un lungo periodo, secernendo anticorpi dotati di alta affinità.

Altri linfociti B del centro germinativo si differenziano, invece, in cellule B memoria. Queste cellule hanno la capacità di sopravvivere per periodi prolungati e di generare una rapida risposta umorale in occasione di una nuova esposizione all'antigene. Alcune di esse rimangono nel linfonodo, mentre altre circolano nel sangue e da lì si stanziano in altri tessuti. Rispetto ai linfociti B *naive*, le cellule della memoria si differenziano per aver subito la maturazione dell'affinità e lo *switching* isotipico, hanno sIg, ma non sono in grado di secernere un alto livello di Ab.

Il meccanismo mediante il quale alcune cellule sono indirizzate verso la differenziazione in plasmacellule e altre in cellule della memoria è ancora sconosciuto.

La nostra attenzione è stata focalizzata sui linfociti B estratti da tonsille: come in tutti gli organi linfoidi secondari si possono distinguere 3 sottopopolazioni principali di linfociti B, ovvero quelli del centro germinativo (GC), quelli del mantello follicolare (FM) e quelli dello strato sottoepiteliale (SE).

La regione sottoepiteliale comprende cellule B *naive* e della memoria ed è analoga alla *marginal zone* della milza. I linfociti B sottoepiteliali sono una sottopopolazione eterogenea relativamente a stato di attivazione (*resting* vs attivati), espressione di IgD (IgD^{low} vs IgD^{neg}), isotipo di Ig prodotte (IgM vs IgG).

La sottopopolazione di linfociti B maggiormente rappresentata a livello delle tonsille è quella delle cellule IgD+CD39+ (25-30%), che sono anche quelle con le dimensioni maggiori. Seguono la frazione CD5+ (15-20%) e quella IgD+ CD38+ CD5- (15-20%) (Figura 6) (Dono et al., 2000).

Le frazioni da me utilizzate sono le seguenti:

- *Resting SE*: non esprimono marker di attivazione CD80 e CD95. Presentano un fenotipo CD10-CD38+/-CD23-CD39-CD24+/-; In superficie inoltre esprimono IgM ma non IgD (solo il 20-30% sono IgD^{low}); inoltre non esprimono CD5.
- *Resting FM*: non esprimono marker di attivazione CD80 e CD95 e presentano un fenotipo CD10-CD38-CD23+CD39+; esprimono in superficie sia IgM che IgD e sono CD5+.
- GC: hanno un fenotipo CD38+CD10+CD77+ ed esprimono IgG in superficie.

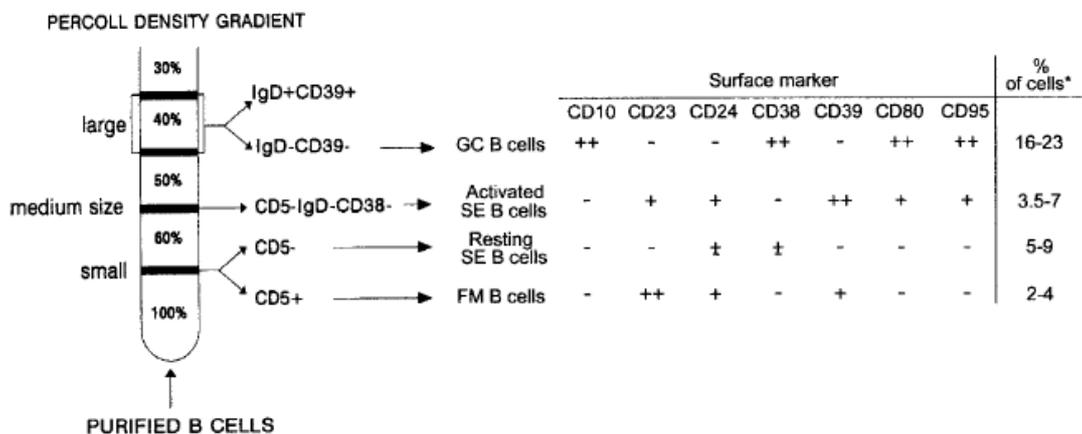


Figura 6 Sottopopolazioni di linfociti B estratte da tonsille e sottoposte a centrifugazione in gradiente di Percoll (le percentuali sono riferite ai linfociti B totali).

2.3 Le cellule dendritiche

Le cellule dendritiche devono il loro nome alla fitta rete di lunghi processi della membrana che si dipartono dal soma cellulare, simili ai dendriti delle cellule nervose (Fig 7).

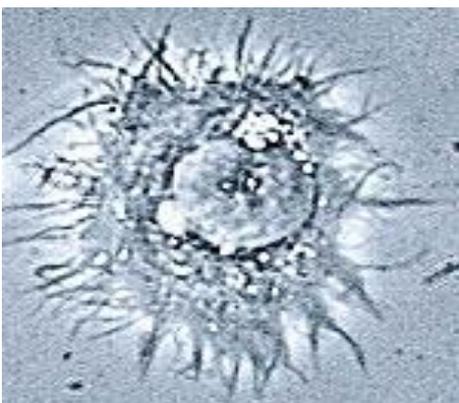


Figura 7 Morfologia di una cellula dendritica

Derivano dagli stessi precursori dei macrofagi e, durante la maturazione, migrano dal midollo osseo ai tessuti periferici; sono stati identificati vari stadi differenziativi

delle DC: *progenitori midollari e monociti circolanti* che costituiscono la sorgente di DC; *DC immature* residenti nei tessuti e responsabili della captazione e della processazione dell'antigene e infine *DC mature*, situate negli organi linfoidi secondari, dove presentano l'antigene ai linfociti T, attivando la risposta immunitaria specifica [Banchereau J et al., 2000].

A seconda della loro localizzazione possono essere suddivise in:

- Cellule del Langherans nell'epidermide e nelle mucose
- Cellule dendritiche interstiziali
- Cellule dendritiche interdigitate nelle regioni ricche di linfociti T degli organi linfoidi secondari e nel timo
- Cellule dendritiche circolanti nel sangue e nella linfa (cellule velate), distinte in mieloidi e plasmacitoidi.

Sono caratterizzate da elevati livelli di espressione delle molecole MHC sia di classe I che di classe II, oltre ai membri della famiglia B7: per questa ragione sono APC molto più potenti di macrofagi e linfociti B. Oltre alle molecole di classe I e II, le cellule dendritiche esprimono un'altra classe di molecole coinvolte nella presentazione dell'antigene: le proteine della famiglia CD1. E' una famiglia di 5 proteine (CD1a, b, c, d, e) coinvolta nella regolazione delle risposte T contro antigeni microbici lipidici o glicolipidici [Banchereau et al., 2000; Guermonprez et al., 2002].

Le cellule dendritiche rimangono nei tessuti, in forma immatura, fino all'arrivo di un patogeno. Dopo averlo fagocitato si spostano, attraverso il sistema linfatico, al linfonodo più vicino, dove interagiscono con i linfociti *naïve* circolanti. Se le cellule dendritiche non si attivano inducono tolleranza verso l'antigene catturato. Le cellule dendritiche immature presentano sulla loro membrana recettori specifici per componenti comuni di alcuni patogeni: l'interazione recettore-ligando stimola la cellula dendritica a fagocitare il patogeno e a degradarlo a livello intracellulare. Le DC reclutano i leucociti al sito dell'infiammazione e amplificano le risposte immuni innate attraverso la produzione di chemochine, citochine infiammatorie e interferoni di tipo I; l'attività fagocitica diminuisce, mentre aumentano l'espressione di molecole MHC di classe I e II e di molecole costimolatorie CD80 (o B7-1), e CD86 (o B7-2). In seguito ad un riarrangiamento del citoscheletro le DC acquisiscono un'elevata capacità motoria, sostenuta dall'aumentata espressione di recettori per le chemochine. Le cellule dendritiche possono fagocitare anche antigeni extracellulari con meccanismo recettore-indipendente detto macropinosi. La principale funzione delle dendritiche non è però quella di distruggere i

patogeni, come invece fanno i macrofagi, ma semplicemente di presentarli ai linfociti T (Fig 8).

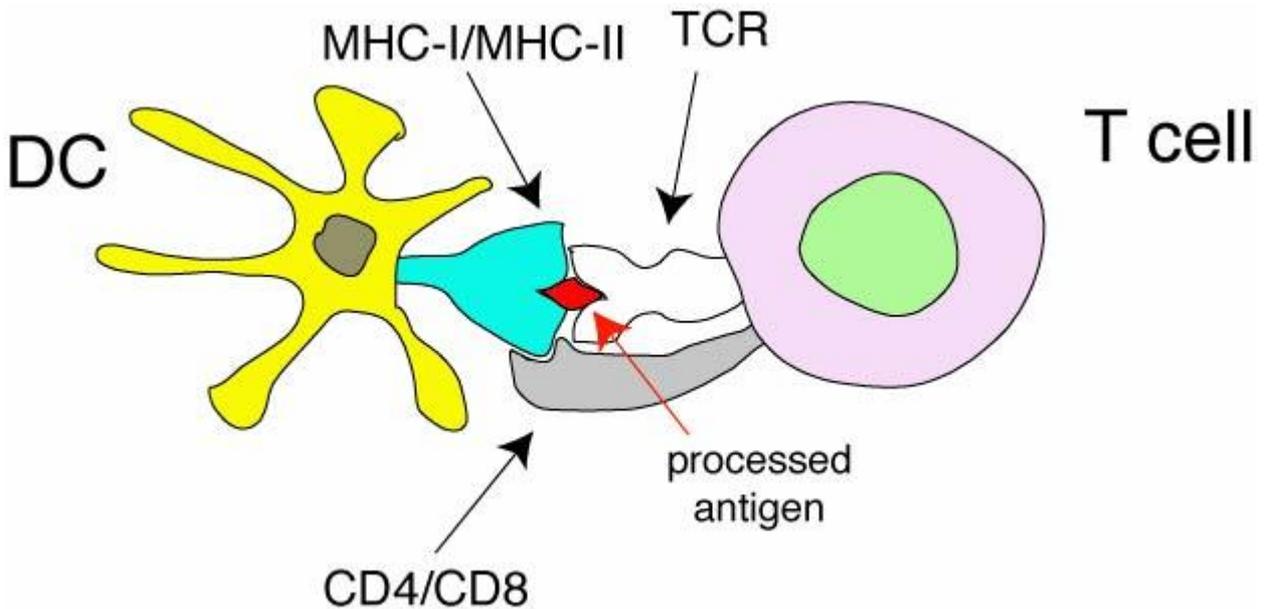


Figura 8 Interazione tra DC e linfociti T

A loro volta i linfociti T-helper attivano le DC mediante l'interazione CD40-CD40L e le DC così attivate sono capaci di stimolare una risposta T-killer [Bennet SRM et al., 1998; Schoenberger SP et al., 1998]. Le cellule dendritiche sono quindi le cellule più potenti ad indurre una risposta T-linfocitaria ed hanno la peculiare capacità di stimolare non solo le cellule T-memoria, ma anche T-linfociti "naïve".

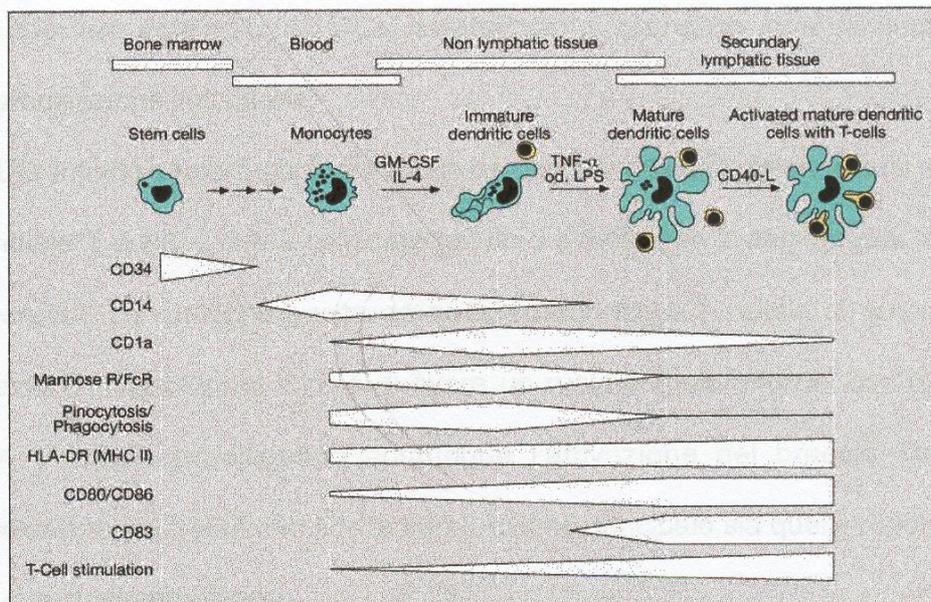


Figura 9 Maturazione delle cellule dendritiche: modificazione dell'espressione antigenica, dell'attività fagocitica e di quella cross-presentante durante il processo differenziativo.

Le DC stimolano la proliferazione e la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B sia indirettamente, grazie all'attivazione dei linfociti T helper, sia direttamente attraverso la produzione di citochine, tra cui l'IL-12 [Palucka et al, 1999]. Le DC inoltre sono in grado di stimolare la citotossicità delle cellule NK sempre con un meccanismo IL-12-dipendente. Le due sottopopolazioni di cellule dendritiche polarizzano in modo diverso il profilo citochinico delle NK: le mieloidi promuovono il rilascio di IFN- γ , mentre le plasmacitoidi stimolano la produzione di IL-4 [Palucka et al., 1999].

2.3 La presentazione dell'antigene

Poiché un antigene proteico estraneo possa essere riconosciuto da un linfocita T, esso deve essere degradato in piccoli peptidi antigenici che si associano fisicamente alle molecole MHC di classe I o di classe II. Inoltre i linfociti, per essere attivati, necessitano di un secondo segnale detto costimolazione. Le APC possiedono sulla loro superficie sia le molecole del complesso MHC sia le molecole costimolatorie e sono quindi in grado di attivare completamente i linfociti T.

2.3.1 Il complesso MHC

Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è un grosso complesso genico con loci multipli. Questi codificano due classi principali di glicoproteine di membrana, le molecole MHC di classe I e di classe II. In linea generale i linfociti T_H riconoscono antigeni legati alle molecole MHC di classe II, mentre i linfociti T_C quelli associati a molecole di classe I.

Nell'uomo le molecole MHC prendono nome di HLA : sono noti 3 loci genici per la classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e 3 loci genici per la classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ).

Ciascuna di queste molecole è caratterizzata da un elevato grado di polimorfismo nella popolazione. Poligenia e polimorfismo del sistema, sono giustificati poiché ciascuna molecola MHC ha una relativa selettività di legame con i peptidi antigenici. Pertanto maggiore è il numero di MHC differenti, maggiore è lo spettro di peptidi antigenici che potranno essere legati e presentati efficacemente ai linfociti T. Quindi ciascun TCR è specializzato nel riconoscimento di un determinato peptide legato ad una determinata molecola MHC, espressa sulla superficie di cellule presentanti l'antigene o di cellule bersaglio.

L'espressione delle molecole MHC di classe II è limitata alle APC, mentre quelle di classe I sono espresse da tutte le cellule nucleate.

2.3.2 La famiglia B7

Le molecole B7 sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline; possiedono un unico dominio di tipo V e un unico dominio di tipo C.

B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) hanno la stessa organizzazione dei domini extracellulari, ma domini intracellulari molto diversi. B7-2 è costitutivamente espresso a bassi livelli sulle APC ed è rapidamente indotto in seguito all'attivazione. L'espressione di B7-1 invece è indotta in un secondo tempo. Ciò sembrerebbe quindi indicare la maggior importanza di B7-2 nella fase iniziale della risposta immunitaria. Le funzioni di B7-1 e B7-2 sono in gran parte sovrapponibili e sembrano quindi differire principalmente nel tempo di espressione. I loro ligandi sulla superficie linfocitaria sono CD28 e CTLA4, anch'essi membri della superfamiglia delle immunoglobuline.

Due nuovi membri di questa famiglia sono B7-h, ligando di ICOS, e PD-L1/PD-L2, ligandi di PD-1

2.3.2.1 B7h, il ligando di H4/ICOS

Il ligando di H4/ICOS è una proteina di 309 aminoacidi espressa sulla superficie delle APC chiamata in vari modi: B7-h, B7RP-1 (B7 related protein-1), LICOS (ligand of ICOS), GL50.

B7-h e H4/ICOS interagiscono con una K_D 33 nM e una off-rate con $t_{1/2}$ di 10 minuti.

B7-h è costituito da un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e una coda citoplasmatica. In particolare possiede un dominio IgV-simile e un dominio IgC-simile analoghi a quelli di B7-1 e B7-2.

A differenza di B7-1 e B7-2, B7-h viene espresso non solo da cellule di derivazione ematopoietica ma anche da altri tessuti. In particolare è espresso a bassi livelli sui linfociti B, sui macrofagi e sulle cellule dendritiche e aumenta in seguito a stimolazione con $\text{IFN}\gamma$. La sua espressione in tessuti non linfoidi non è del tutto chiara.

Scopo del lavoro

La molecola H4/ICOS, espressa sulla superficie dei linfociti T attivati, svolge un ruolo chiave nella modulazione della risposta immunitaria interagendo con il suo ligando B7h, costitutivamente espresso dalle cellule presentanti l'antigene professioniste (APC), ovvero cellule dendritiche (DC), macrofagi e linfociti B, ma anche da altri tipi cellulari. La maggior parte degli studi esistenti sono stati focalizzati sugli effetti che la stimolazione di H4/ICOS ha sui linfociti T e in particolare su come essa ne influenza la proliferazione e l'acquisizione di attività effettrici. Pochi dati sono invece disponibili sugli effetti della stimolazione di B7h sulle APC (*reverse signaling*).

Mediante l'utilizzo di una forma solubile di ICOS (ICOS-Ig), ci siamo proposti di valutare gli effetti della stimolazione di B7h, sull'attivazione di cellule dendritiche (DC) e macrofagi (MDM) derivati da monociti circolanti e di linfociti B estratti da tonsille.

Materiali e metodi

1. Cellule

1.1 cellule dendritiche e macrofagi

I monociti CD14+ circolanti costituiscono la fonte più facilmente disponibile per la generazione ex-vivo di DC ed MDM (*monocyte derived macrophages*).

PBMC umani sono stati isolati da preparazioni concentrate di sangue periferico (buffy-coat) tramite centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). Dopo due ore di incubazione a 37°C e 5% di CO₂, in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD), contenente 5% FBS (v/v) (Fetal Bovine Serum) (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 40 mg/ml di gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italia), penicillina e streptomina, le cellule non aderenti sono state rimosse e le cellule aderenti contate e piastrate (500000 cellule per punto) per il differenziamento. Il metodo standard per la generazione di DC a partire da monociti CD14+ si basa sulla coltura degli stessi in RPMI 1640 contenente 10% di FBS in presenza di due citochine fondamentali, il fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF), che promuove la differenziazione cellulare verso la linea mielo-monocitica, e l'Interleuchina 4 (IL-4) (IL4-DC), che inibisce il differenziamento di macrofagi. (Szabolics P. *et al.*, 1996). Questo regime promuove lo sviluppo dopo 5-6 giorni di coltura di DC (IL4-DC) immature, non aderenti, estremamente efficienti nel catturare e processare gli antigeni da dotate di scarsa di indurre la proliferazione di linfociti T naive (figura 10). Tuttavia, tali cellule non sono completamente differenziate e regrediscono ad uno stato di cellule aderenti monocitoidi se le citochine impiegate per il differenziamento vengono rimosse dal mezzo di coltura. Per la generazione di MDM il protocollo è del tutto simile, fatta eccezione per l'IL-4 che non deve essere presente e per la concentrazione di FBS che è pari al 5%.



Figura 10 Morfologia delle DC dopo 6 giorni di coltura

L'aggiunta di stimoli maturativi differenti, quali LPS, CD40L e poli I:C, nel mezzo di coltura determina la maturazione delle IL4-DC che aumentano l'espressione a livello di

membrana dei complessi peptide-MHC [Cella M. *et al.*, 1997], delle molecole costimolatorie (CD80, CD86 e CD40) e di adesione, dei recettori chemochinici, quali il CCR7, che dirigono la migrazione delle DC agli organi linfoidi secondari [Sallusto F. *et al.*, 1999] e quindi della loro capacità immunostimolante. Le cellule dopo maturazione risultano completamente differenziate in DC e in seguito alla rimozione delle citochine, impiegate per il differenziamento, non regrediscono a monociti.

Complessivamente, queste osservazioni portano alla conclusione che la completa differenziazione dei monociti a DC, in presenza di GM-CSF e IL-4 richiede necessariamente due fasi successive di coltura; DC immature vengono generate dopo 5-6 giorni di coltura mentre sono necessari ulteriori 1-2 giorni per il completo differenziamento di DC mature, capaci di indurre la proliferazione delle cellule T.

1.2 Linfociti B

I linfociti B sono stati estratti da tonsille di bambini di 5-12 anni sottoposti a tonsillectomia presso l'ospedale Giannina Gaslini di Genova e l'ospedale Maggiore della Carità di Novara.

Le tonsille sono state disgregate con l'uso di un bisturi in soluzione fisiologica. Le cellule mononucleate tonsillari rimaste in sospensione dopo aver lasciato depositare i residui di tessuto connettivo (TMC, *tonsillar mononuclear cells*) sono state separate dalle restanti popolazioni cellulari tramite centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway).

Per separare i linfociti B dai linfociti T si è sfruttata la capacità che questi ultimi hanno di legarsi alle emazie di pecora (SRBC, *sheep red blood cells*, Oxoid) attraverso il recettore CD2, per formare aggregati detti rosette. Tali aggregati sono facilmente isolabili dai linfociti B liberi tramite centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway).

1.2.1 Preparazione delle SRBC

Le SRBC fornite dalla ditta vengono diluite in proporzione 1:4 con soluzione fisiologica e trattate per 15 minuti a 37°C con neuraminidasi (sialidasi, Roche), un enzima in grado di idrolizzare gli acidi sialici sulla superficie delle emazie stesse e permettere così la reazione di agglutinazione con i linfociti T.

1.2.2 Rosettatura

60×10^6 TMC vengono incubate per 10 minuti a 37°C con 2ml di SRBC (trattate con neuraminidasi) in RPMI 1640 10% FBS. La reazione viene fermata lasciando 30 minuti in ghiaccio. Le cellule vengono quindi centrifugate, risospese delicatamente (per non disgregare le rosette formatesi) in 2ml di RPMI 1640 10% FBS e stratificate su 3 ml di Ficoll (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). In seguito a centrifugazione i linfociti B si concentreranno nell'anello all'interfaccia tra terreno e Ficoll, mentre i linfociti T si stratificheranno sul fondo legati alle SRBC.

1.2.3 Separazione in gradiente discontinuo di Percoll

L'utilizzo di un gradiente discontinuo di Percoll (GE Healthcare) permette di separare i linfociti B ottenuti nei passaggi precedenti in varie sottopopolazioni in base a densità e dimensioni cellulari. In generale cellule di piccole dimensioni ed elevata densità sono considerate cellule quiescenti (in fase G_0 , dette *resting*) e tendono a stratificarsi all'interfaccia delle frazioni più concentrate del gradiente. Il discorso inverso vale per le cellule di dimensioni più elevate.

Il Percoll viene diluito, in rapporto 10:1, con un tampone contenente colorante e sali (HBSS, *Hank's balanced salt solution w/o calcium and magnesium*, Gibco). Per ottenere le frazioni a differente densità la soluzione precedente viene ulteriormente diluita con RPMI 1640 *serum free*.

In particolare i linfociti B sono stati separati in frazioni di differente densità tramite centrifugazione attraverso frazioni al 30, 40, 50, 60 e 100% di Percoll (figura 11).

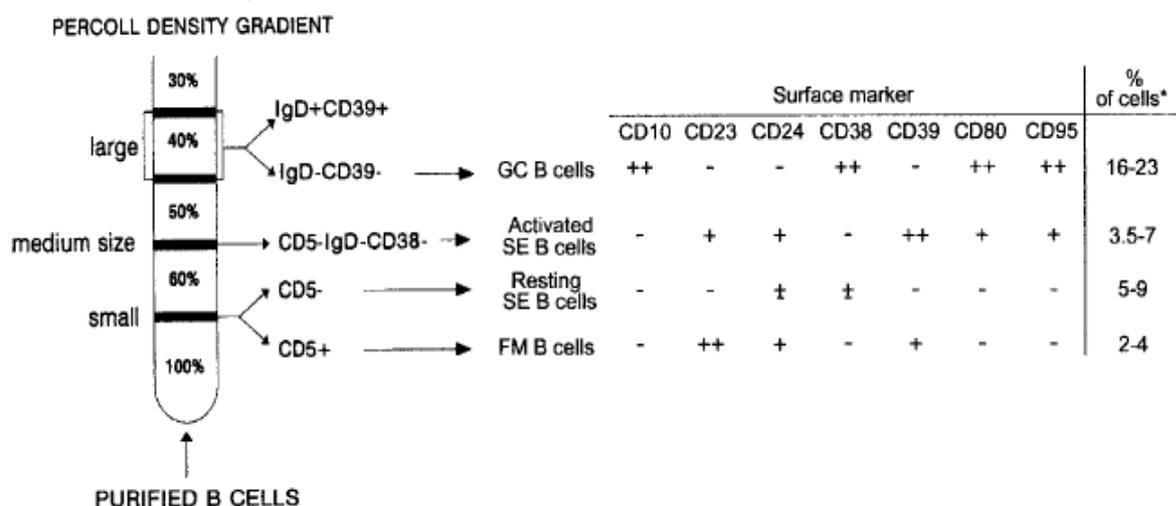


Figura 11 Sottopopolazioni presenti nei diversi anelli formati dopo centrifugazione in gradiente di densità (le percentuali si riferiscono ai linfociti B totali).

1.2.4 Separazione di sottopopolazioni di linfociti B tramite anticorpi monoclonali.

In figura 11 sono elencati i principali marker presenti sulla superficie cellulare delle varie sottopopolazioni. E' possibile sfruttarli per isolarle.

Esistono numerosi metodi per separare sottopopolazioni cellulari marcate con anticorpi monoclonali, tra cui *panning* su piastre rivestite dell'anticorpo in questione, rosettatura con emazie rivestite di anticorpo, uso di biglie magnetiche rivestite di anticorpo oppure *cell sorting* (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*).

In seguito alla centrifugazione in gradiente discontinuo di Percoll sono state raccolte le frazioni all'interfaccia tra percoll 30% e 40% e tra 40% e 50% (che vengono riunite in un'unica frazione, frazione A) e quella all'interfaccia tra 100% e 60% (frazione B).

Da queste frazioni è possibile ottenere GC, SE e FM utilizzando appunto anticorpi monoclonali.

Il maggiore svantaggio dei vari sistemi elencati è rappresentato dalla difficoltà di recuperare le cellule marcate (selezione positiva) in numero sufficiente e in condizioni adatte alla successiva coltura.

Le metodiche da noi utilizzate sono:

- Dynabeads Pan Mouse IgG (DynaL Biotech) (1.2.4.1)
- Colonne MACS (Miltenyi Biotec, Germany) (1.2.4.2)

1.2.4.1 Dynabeads Pan Mouse IgG

Le cellule vengono incubate per 30 minuti a 4°C con gli anticorpi rivolti contro i marcatori caratteristici della sottopopolazione che vogliamo isolare (selezione positiva) oppure contro quelli caratteristici delle cellule che vogliamo eliminare (selezione negativa). Dopo aver lavato l'anticorpo in eccesso non legato, le cellule vengono incubate con dynabeads per altri 10 minuti a 4°C. Le dynabeads sono biglie magnetiche rivestite con anticorpo secondario diretto contro il frammento Fc degli anticorpi primari utilizzati nel passaggio precedente. Le cellule marcate si legano quindi alle biglie magnetiche che a loro volta possono essere isolate dalla sospensione utilizzando un magnete.

Nel nostro caso la frazione A è stata incubata con anti-CD23 e anti-CD39 (BD biosciences): la frazione positiva rimane legata al magnete mentre quella negativa viene raccolta ed è costituita esclusivamente da cellule del centro germinativo o GC (selezione negativa: le biglie e gli anticorpi permettono di eliminare tutte le cellule non appartenenti alla sottoclasse di interesse).

La frazione B invece è stata incubata con anti-CD3 (per eliminare eventuali linfociti T ancora presenti), anti-CD10 e anti-CD38 (per eliminare GC) e anti-CD16 (per eliminare monociti e *natural killer*) ed è stata poi raccolta la frazione negativa, che è rappresentata dalle cellule *resting* della frazione sottoepiteliale (SE) e del mantello follicolare (FM).

1.2.4.2 Colonne MACS

Il sistema delle colonne MACS è stato utilizzato per separare le SE dalle FM all'interno della frazione B, già trattata con Dynabeads.

Il sistema MACS è costituito da un magnete e da colonnine cromatografiche impaccate con una matrice in grado di creare un forte campo magnetico se messa in contatto con un magnete.

In particolare la frazione *resting* ottenuta per trattamento della frazione B con Dynabeads è stata incubata con antiCD5-PE, un marcatore specifico delle cellule del mantello follicolare (FM) e in un secondo passaggio con anticorpo anti-PE coniugato a biglie magnetiche.

Quindi la frazione negativa, che non viene trattenuta eluendo la colonna, è rappresentata dai linfociti B sottoepiteliali (SE), mentre la frazione positiva, che è possibile recuperare eluendo la colonna in assenza del magnete, è costituita dai linfociti B del mantello follicolare (FM).

2. Congelamento e scongelamento dei PBL

I PBL arricchiti tramite deplezione della frazione monocitaria capace di aderire alla plastica sono stati contati in camere di Kova, utilizzando il colorante blu di Trypan e poi risospesi in terreno "R20/10_{FCS/DMSO}" costituito da terreno R20_{FCS} addizionato con DMSO (dimetilsolfossido) al 10% v/v come criopreservante. Le cellule sono state conservate a -80°C.

Al momento dell'utilizzo, le cellule sono state scongelate rapidamente in bagnetto termostato a 37°C e quindi diluite con terreno R20_{FCS}. Dopo un lavaggio a 250g per 15 minuti, le cellule sono state risospese in terreno R10_{FCS} e la quantità di cellule vitali è stata determinata mediante conta cellulare in camere di Kova, utilizzando il colorante blu di Trypan per l'esclusione delle cellule morte.

Alla fine le cellule sono state portate alla concentrazione necessaria per l'allestimento delle colture (3x10⁶ cellule/mL).

3. Valutazione morfologica di DC ed MDM

L'aspetto morfologico di DC ed MDM è stato valutato in microscopia confocale a fluorescenza. Le cellule sono state raccolte, lavate ripetutamente con PBS, privo di calcio e magnesio, e incubate per 1 minuto a temperatura ambiente con 100µl di soluzione di Arancio d'Acridina (1mg/ml); le cellule colorate sono state nuovamente lavate con PBS e poste su di un vetrino per l'analisi microscopica.

L'arancio d'acridina è un fluorocromo della famiglia delle acridine, specifico per gli acidi nucleici. E' definito metacromatico, ossia con due diverse frequenze di emissione, in seguito ad eccitazione alla lunghezza d'onda di 480nm. A bassa concentrazione, e con rapporto colorante/proteine basso, l'arancio d'acridina si lega al DNA doppia elica ed emette fluorescenza verde intorno ai 525nm; all'aumentare del rapporto colorante/proteine, l'arancio d'acridina provoca condensazione degli acidi nucleici a singola elica (DNA o RNA) ed emette fluorescenza rossa attorno ai 575nm.

4. Caratterizzazione immunofenotipica delle DC, degli MDM e delle sottopopolazioni di linfociti B

Per la caratterizzazione immunofenotipica, campioni di 0.1×10^6 cellule / 100 μ l di 1% FBS-PBS sono stati incubati per 30 minuti al buio e a 4°C con i seguenti anticorpi monoclonali (mAb) coniugati con (FITC), ficoeritrina (PE), PerCP, PE-cyanin5 o PE-cyanin7:

- MDM/DC: anti-CD1a, -CD14, -HLA-A/B/C, -HLA-DR, -CD83, -CD80, -CD86, -CD16, -human Ig, -anti B7h (Becton Dickinson).
- Linfociti B: anti-CD19, -CD5, -CD38, -CD3, -HLA-DR, -CD22, -CD23, -B7h, -CD77, -CD10 (Beckton Dickinson).

Al termine dell'incubazione, i campioni vengono lavati con 1.5 mL 1% FBS-PBS per eliminare le eventuali tracce di anticorpi in eccesso e i pellet vengono risospesi in 200 μ l di 1% PFA-PBS e conservati a 4°C.

Entro 24 ore dalla preparazione, i campioni vengono analizzati in citofluorimetria con un citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson), selezionando le cellule in modo da escludere dall'analisi i detriti cellulari ed eventuali linfociti contaminanti.

Quando sono stati utilizzati mAb non coniugati, le cellule sono state lavate e poi re-incubate, sotto le stesse condizioni, con l'anticorpo Goat anti-mouse, FITC o PE, anti-hamster FITC o anti-rat FITC. Dopo 30 min. di incubazione in ghiaccio, le cellule sono state lavate in PBS 3 volte ed immediatamente analizzate al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

5. Stimoli utilizzati

MDM e DC sono state stimulate, al termine dei 5 giorni di differenziamento con GM-CSF, per 48h con Lipopolisaccaride (LPS) 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e con la proteina di fusione ICOS-Ig 1 μ g/ml (R&D system).

I linfociti B invece sono stati attivati con stimoli di diversa natura, in presenza e in assenza di ICOS-Ig 1 µg/ml (R&D system):

1. SAC (*Staphilococcus aureum Cowan I*, Pansorbina, Calbiochem) 5 µg/ml;
2. IL-2 100U/ml (Sigma)
3. PMA (*phorbol myristate acetate*, Sigma) 10ng/ml;
4. antiCD40 5 µg/ml (Immunotech, France)
5. IL-4 100U/ml (Peprtech)

5. Valutazione della capacità allostimolatoria delle DC e degli MDM in coltura linfocitaria mista (MLR).

La capacità allostimolante delle DC e degli MDM generati da monociti è stata valutata incubando le stesse con PBL allgenici in rapporto 1:20 in piastre a 96 pozzetti a fondo a U. In particolare $5 \cdot 10^4$ PBL sono stati incubati con $5 \cdot 10^3$ DC o MDM in terreno RPMI 10% FBS per 5 giorni a 37°C in atmosfera umidificata. Per valutare l'avvenuta proliferazione timidina triziata $^3\text{H-TdR}$ (amersham, Little Chalfont) (0.5 µCi/pozzetto, 28 Ci/mmol) è stata aggiunta durante le ultime 6 ore di coltura. Le cellule sono state quindi sacrificate e analizzate al contatore β.

6. Valutazione della produzione di anione superossido

Il dosaggio della produzione di anione superossido è stato effettuato su MDM. Dopo una preincubazione di 24 ore con ICOS-Ig [R&D System] in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD) privo di rosso-fenolo (per evitare interferenze con la lettura spettrofotometrica) e di FBS a 37°C. Gli MDM sono stati incubati per 30 minuti al buio con citocromo c 1mg/ml [Sigma]. Gli effetti di ICOSIg sono stati comparati con quelli di evocati dal PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) 10^{-7} M [Sigma], un tipico attivatore della proteinchinasi C e da LPS (lipopolisaccaride) 500 ng/ml [Sigma]. La produzione di anione superossido è stata valutata sulla base della reazione di riduzione del citocromo c, sensibile all'inibizione da parte della SOD (superossido dismutasi) [Sigma]. Le differenze di assorbanza sono state valutate alla lunghezza d'onda di 550 nm tramite spettrofotometro Beckman DU 650. La produzione di superossido si esprime in nmol di citocromo c ridotto da 10^6 cellule in 30 minuti, usando come coefficiente di estinzione 21,1 mM [Brunelleschi S. et al., 2001]. I valori di controllo (produzione di anione superossido in assenza di stimoli) sono stati sottratti da tutte le altre acquisizioni.

7. Valutazione della produzione di citochine da parte di DC ed MDM

Il dosaggio delle citochine nei surnatanti delle colture di DC ed MDM dopo 5 o 7 giorni di coltura è stato effettuato mediante il kit Human Inflammation Cytometric Bead Array (CBA) (Beckton Dickinson), che permette, tramite analisi citofluorimetrica, la rivelazione simultanea delle seguenti citochine: IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β .

Per dosare le citochine presenti nei surnatanti delle MLR è stato invece utilizzato un kit analogo (Human Th1/Th2 CBA, BD) in grado di rivelare simultaneamente IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4, IL-2 e TNF- α .

8. Valutazione del differenziamento (produzione di immunoglobuline) dei linfociti B

GC, FM ed SE sono state incubate per 5 giorni con gli stimoli precedentemente elencati in presenza e in assenza di ICOS-Ig.

Gli effetti di tali stimoli sul differenziamento sono stati valutati misurando la produzione di immunoglobuline tramite ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). In particolare abbiamo valutato la produzione di IgM mediante anticorpo anti-IgM coniugato a perossidasi alcalina (AP) (Southern Biotech, USA). AP è in grado di reagire con il substrato p-nitro-fenilfosfato (Sigma) per trasformarlo in un derivato rivelabile con lettura spettrofotometrica a 405 nm.

9. Valutazione degli effetti sull'apoptosi

Gli eventuali effetti in termini di protezione o induzione dell'apoptosi di ICOS-Ig su GC, FM ed SE sono stati valutati tramite lettura citofluorimetrica dopo colorazione con annessina V-FITC e propidio ioduro (PI) (Instrumentation Laboratory, Italy)). L'annexina V si lega alla fosfatidilserina che viene esposta sul lato extracellulare delle cellule in apoptosi. Il PI invece intercala il DNA ma non è in grado di superare la membrana cellulare: colora quindi soltanto le cellule in necrosi, la cui membrana cellulare è danneggiata e permeabile. PI viene visualizzato al citofluorimetro in FL2 (come PE).

Risultati 1 - MDM e DC

1. Differenziamento di cellule dendritiche (DC) e di macrofagi (MDM) a partire da monociti CD14+

L'induzione del differenziamento in DC in presenza di GM-CSF e di IL-4 a partire da monociti arricchiti tramite l'aderenza su plastica ha permesso di avere dopo 5 giorni di coltura il $78.0 \pm 6\%$ (media \pm SD di 10 esperimenti) di cellule con morfologia dendritica

Il differenziamento in MDM in presenza di GM-CSF a partire da monociti ha permesso di avere dopo 5 giorni di coltura il $69.0 \pm 11\%$ (media \pm SD di 10 esperimenti) di cellule con morfologia macrofagica (Figura 12)

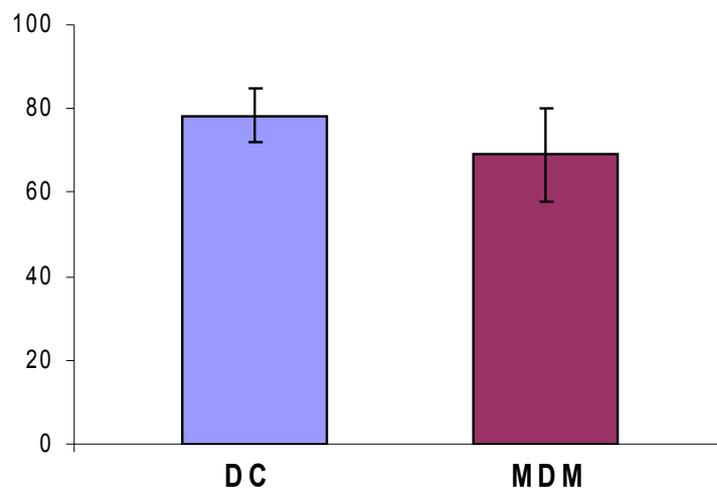


Figura 12 Resa percentuale di cellule differenziate

L'avvenuto differenziamento è stato anche verificato tramite analisi morfologica al microscopio confocale previa colorazione con arancio di acridina (Figura 13)

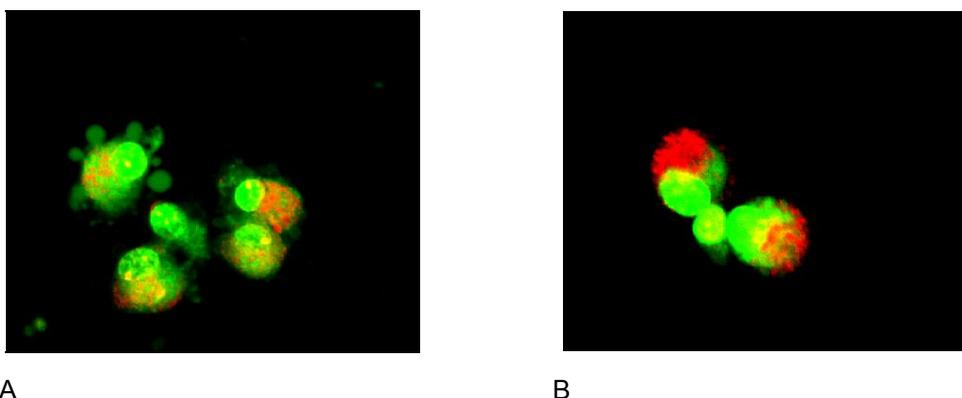


Figura 13 Morfologia delle DC (A) e degli MDM (B) dopo 5 giorni di differenziamento

2. Caratterizzazione immunofenotipica

Per meglio caratterizzare le popolazioni cellulari differenziate è stato analizzato, mediante citofluorimetria, il loro immunofenotipo. Come evidenziato in Tabella 1 i risultati ottenuti dimostrano un aumento dell'espressione di CD1a, marcatore espresso dalle DC differenziate, e una parallela diminuzione dell'espressione di CD14, marcatore monocitario, dopo 5 giorni di coltura in presenza di GM-CSF e IL-4.

In Tabella 1 sono anche riportati i risultati relativi al differenziamento macrofagico; gli MDM mostrano un'espressione di CD14 confrontabile con quella dei monociti di partenza e un'aumentata espressione di CD16.

Le molecole costimolatorie CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) si sono rivelate costitutivamente presenti sulla superficie di tali cellule, così come il ligando di H4/ICOS, B7h.

	MONOCITI	DC	MDM
CD14	95.37±3.26	3.65±2.55	94.14±3.26
CD16	25.76±9.76	nv	45.42±20.28
CD1a	nv	65.29±10.36	nv
CD80	2.34±1.73	59.77±13.18	54.37±19.47
CD86	93.58±9.16	88.94±10.93	93.96±3.79
B7h	2.38±1.52	65.70±12.12	67.30±13.65
HLA-ABC			99.24±0.23
HLA-DR			99.44±0.04
CD83	nv	12.71±2.14	nv

Tabella 1 Caratterizzazione immunofenotipica di DC ed MDM

3. Capacità di rispondere a stimoli di origine batterica

DC (Tabella 2) ed MDM (Tabella 3) sono stati trattati con lipopolisaccaride (LPS), un tipico stimolo di origine batterica. La risposta a tale stimolo è stata valutata come percentuale di espressione delle molecole MHC di classe I (HLA A,B e C) e di classe II (HLA DR), mediante analisi citofluorimetrica.

Inoltre è stata valutata la modulazione dell'espressione delle molecole costimolatorie CD80, CD86 e B7h e di CD83, tipico marcatore di attivazione dendritica.

	DC	DC + LPS
CD80	59.77±13.18	98.50±0.99
CD86	88.94±10.93	99.82±0.18
B7h	65.70±12.12	61.71±10.33
HLA-ABC	94.84±	99.04±1.04

HLA-DR	98.97±0.04	99.30±0.18
CD83	12.71±2.14	88.72±12.16

Tabella 2 Risposta delle DC a stimoli di origine batterica

	MDM	MDM+LPS
CD80	54.37±19.47	94.13±4.97
CD86	93.96±3.79	98.73±1.22
B7h	67.30±13.65	58.52±9.63
HLA-ABC	99.24±0.23	98.67±0.74
HLA-DR	99.44±0.04	98.45±0.62

Tabella 3 Risposta degli MDM a stimoli di origine batterica

Gli stessi marcatori sono stati valutati anche su cellule trattate sia con LPS che con ICOS-Ig, per vedere se la stimolazione di B7-h fosse in qualche modo in grado di influenzare l'attivazione stessa di tali cellule (Tabelle 4-5).

	DC+H4	DC + LPS/H4
CD80	87.96±5.85	98.49±1.71
CD86	83.58±13.71	99.79±0.21
B7h	66.74±4.56	56.09±7.70
HLA-ABC	99.93±0.05	99.91±0.01
HLA-DR	98.37±1.60	99.66±0.23
CD83	20.95±13.97	89.50±10.44

Tabella 4 Modulazione dell'attivazione di DC da parte di H4/ICOS

	MDM+H4	MDM + LPS/H4
CD80	71.89±24.05	93.94±8.57
CD86	95.49±4.29	99.89±0.54
B7h	51.68±5.41	59.95±3.98
HLA-ABC	99.16±1.04	99.72±0.24
HLA-DR	99.45±0.35	89.39±12.87

Tabella 5 Modulazione dell'attivazione di MDM da parte di H4/ICOS

4. Capacità di indurre proliferazione di PBL

Sono state allestite colture leucocitarie miste (MLR) eterologhe e sono state valutate le risposte proliferative di PBL a contatto con cellule trattate solo con LPS, H4 da soli o in combinazione. La prestimolazione delle APC con H4/ICOS sembra inibire in qualche modo l'efficacia di tali cellule nell'indurre la proliferazione linfocitaria in presenza di LPS (Figure 14÷17: I valori di proliferazione sono espressi in cpm).

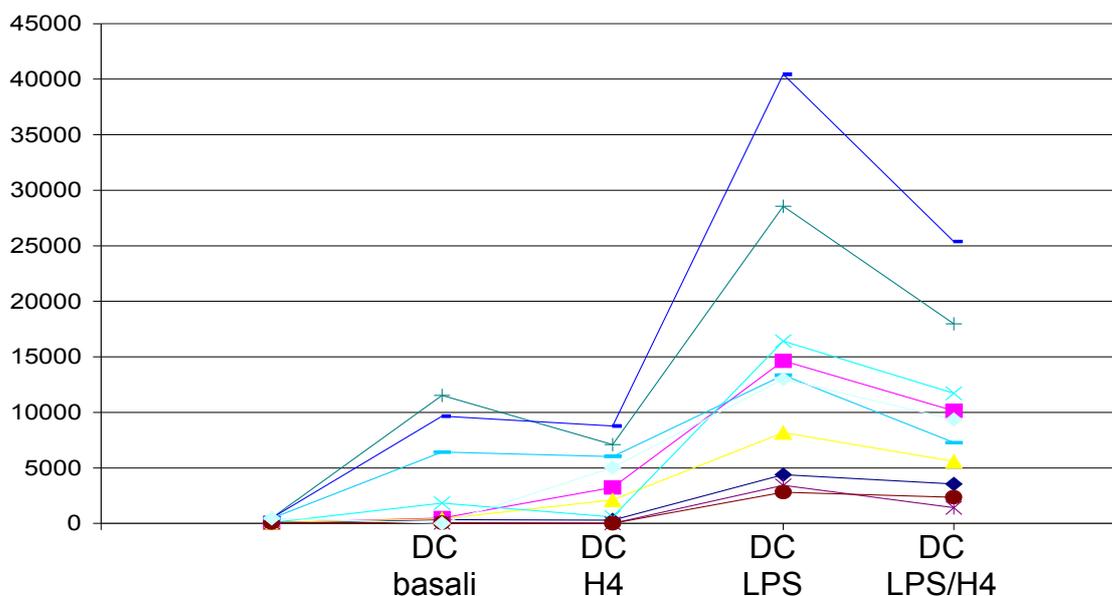


Figura 14 Effetti di DC trattate con H4 ed LPS sulla proliferazione di PBL eterologhi

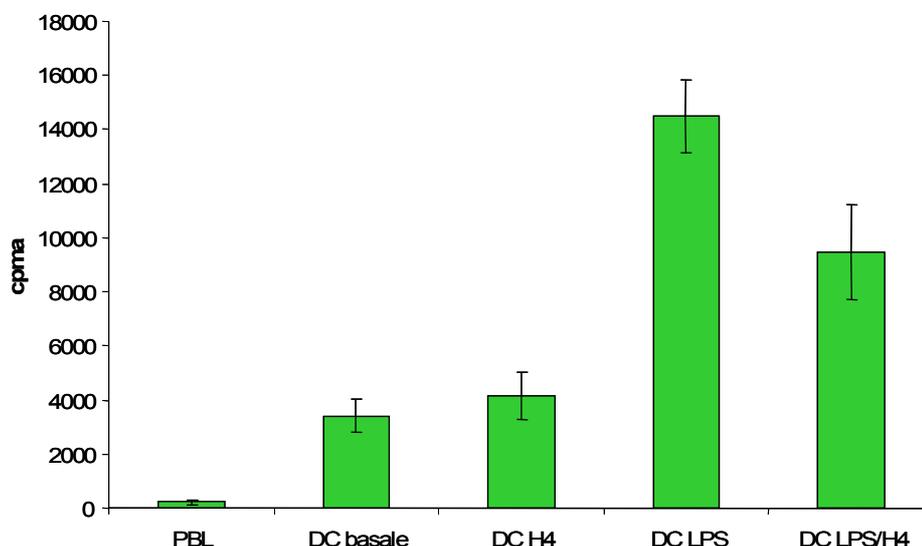


Figura 15 Valori medi e deviazioni standard degli esperimenti in figura 13

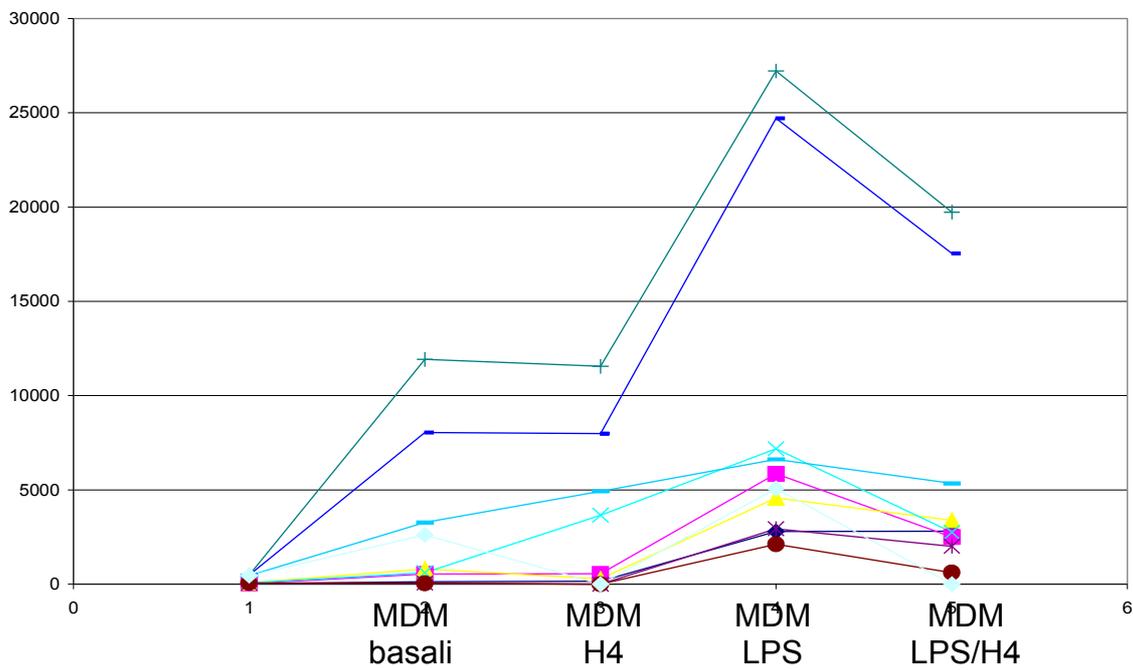


Figura 16 Effetti di MDM trattati con H4 ed LPS sulla proliferazione di PBL eterologhi

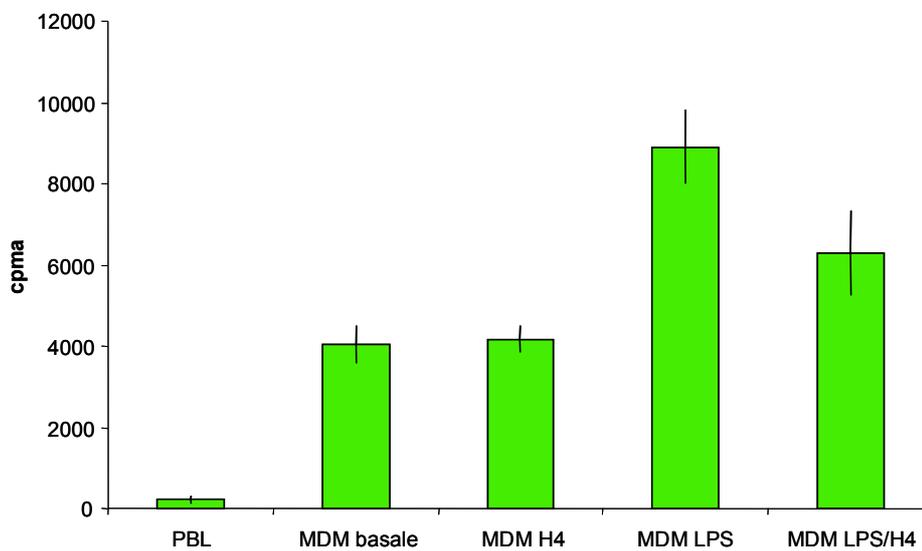


Figura 17 Valori medi e deviazioni standard degli esperimenti in figura 15

5. Produzione di anione superossido

Uno dei meccanismi che gli MDM hanno a disposizione per uccidere i patogeni fagocitati è la produzione di radicali dell'ossigeno. Per questo motivo il dosaggio di anione superossido può essere considerato un buon indicatore dell'attività macrofagica. In particolare è stata valutata la produzione di superossido in condizioni di ristimolazione: in particolare le cellule sono state preincubate per 24 ore con LPS e per 1 ora con PMA, un analogo del DAG (DiAcilGlicerolo) in grado di attivare la proteinchinasi C (PKC).

I risultati ottenuti sembrano concordare con l'andamento notato negli esperimenti di proliferazione: cellule trattate con LPS/PMA e H4 producono meno anione superossido rispetto a cellule trattate solo con LPS/PMA (Figura 18).

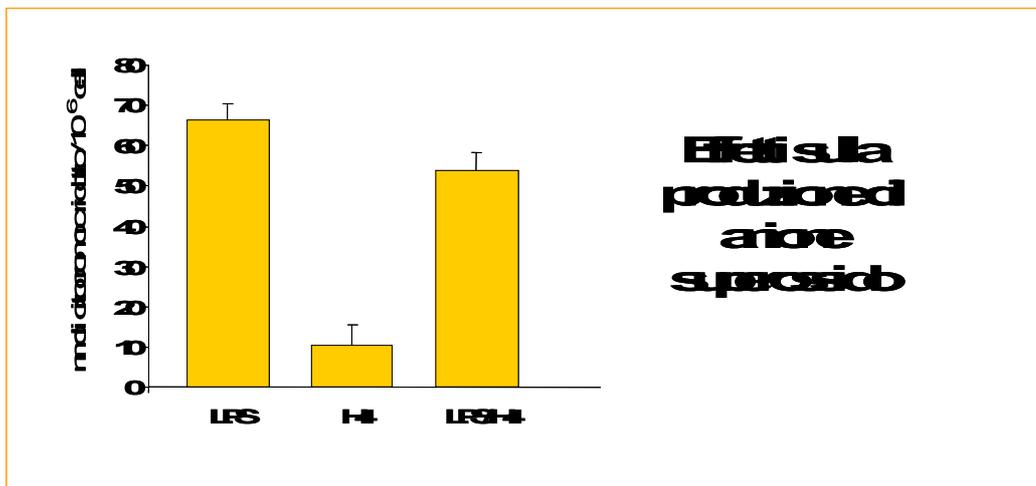


Figura 18 Produzione di anione superossido da parte di MDM

6. Produzione di citochine infiammatorie da parte di DC ed MDM

Le citochine secrete da monociti, DC ed MDM sono state dosate nei surnatanti delle colture dopo 5 giorni di differenzimento mediante analisi citofluorimetrica utilizzando un kit commerciale che ha permesso di valutare simultaneamente le seguenti citochine infiammatorie: IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8.

Sia DC che MDM hanno una secrezione più alta di di IL-6 (monociti vs DC: 32.33 ± 12.04 vs 132.27 ± 65.80 pg/ml; monociti vs MDM: 32.33 ± 12.04 vs 908.77 ± 184.47 ; media \pm DS di 5 esperimenti), rispetto ai monociti di partenza. Le DC inoltre sono in grado di secernere anche una maggiore quantità di TNF- α (monociti vs DC: 3.27 ± 0.89 vs 17.37 ± 6.67 pg/ml; media \pm DS di 5 esperimenti). La produzione delle altre citochine testate è

risultata invece sovrapponibile a quella prodotta dai monociti di partenza sia per le DC sia per gli MDM.

La produzione delle stesse citochine infiammatorie è stata valutata anche dopo stimolazione con stimoli maturativi (LPS, ICOS-Ig). Esperimenti preliminari di cinetica hanno indicato che i livelli di tutte le citochine da analizzare era massimo dopo 48 ore in risposta a tutti gli stimoli testati; di conseguenza, tutte le citochine secrete sono state misurate dopo 48 ore dalla stimolazione.

Le DC coltivate in presenza di LPS hanno una secrezione più alta delle citochine IL-12p70, TNF- α , IL-10 ed IL-6. Le stesse cellule maturate per 48 ore con ICOS-Ig invece hanno una produzione delle citochine testate del tutto sovrapponibile a quelle immature ad eccezione dell'IL-6 che viene secreta in minore quantità (DC basali vs DC ICOS-Ig: 132.27 ± 65.80 vs 45.72 ± 7.41 ; media V DS di 5 esperimenti). L'utilizzo della combinazione LPS /ICOS-Ig per 48 ore determina un aumento nella produzione di IL-12p70, IL-6 rispetto alle condizioni basali ma con valori analoghi a quelli dosati nei surnatanti delle cellule stimulate con il solo LPS. Invece la secrezione delle citochine IL-10 e IL-1 β aumenta notevolmente rispetto alle concentrazioni dosate utilizzando i due differenti stimoli separatamente, mentre quella del TNF- α diminuisce rispetto all'LPS (figura 19).

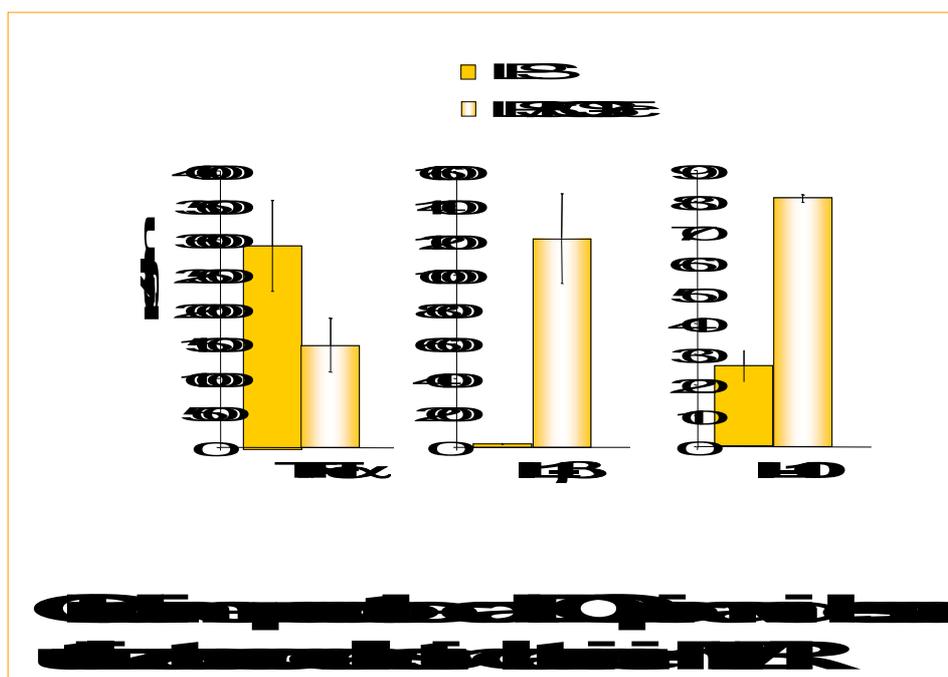
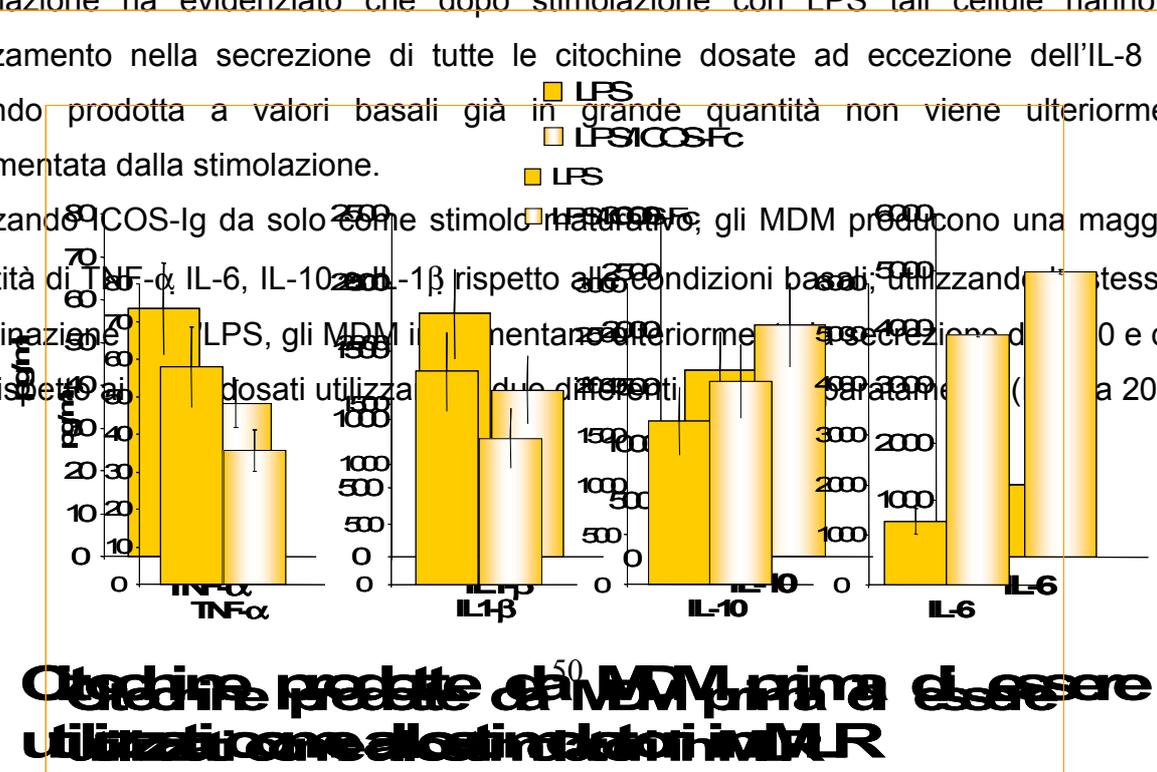


Figura 19 Citochine prodotte da DC dopo 5 giorni di differenziamento e 2 giorni di maturazione. In figura sono state riportate solo le citochine i cui livelli variavano significativamente in presenza di ICOS-Ig.

Per quanto riguarda gli MDM, il dosaggio delle citochine infiammatorie dopo 48 ore di stimolazione ha evidenziato che dopo stimolazione con LPS tali cellule hanno un innalzamento nella secrezione di tutte le citochine dosate ad eccezione dell'IL-8 che essendo prodotta a valori basali già in grande quantità non viene ulteriormente incrementata dalla stimolazione.

Utilizzando ICOS-Ig da solo come stimolo maturativo, gli MDM producono una maggiore quantità di TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β rispetto alle condizioni basali; utilizzando lo stesso in combinazione con LPS, gli MDM incrementano ulteriormente la secrezione di IL-10 e di IL-6 rispetto ai dosaggi utilizzati separatamente (Tabella 20).



Citochine prodotte da MDM prima di essere utilizzate come stimolatori in MLR

Figura 20 Citochine prodotte da MDM dopo 5 giorni di differenziamento e 2 giorni di maturazione. In figura sono state riportate solo le citochine i cui livelli variavano significativamente in presenza di ICOS-Ig.

7. Produzione di citochine T_H1 e T_H2 durante la reazione mista leucocitaria (MLR)

I surnatanti della reazione leucocitaria mista sono stati raccolti al quinto giorno e, tramite analisi citofluorimetrica sono stati valutati i livelli delle seguenti citochine T_H1 e T_H2 : IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-2.

La stimolazione indotta dalle DC maturate in presenza di LPS induce la secrezione di alte dosi di IFN- γ , IL-2 ed IL-5 rispetto a quelle dosate nei surnatanti dei linfociti T stimolati con DC immature (basale) (DC basale vs DC LPS: IFN- γ 12.1 ± 5.9 vs 1160.4 ± 118.3 pg/ml; IL-2 33.6 ± 5.3 vs 59.0 ± 4.2 pg/ml; IL-5 2.4 ± 0.4 vs 3508 ± 5.9 pg/ml). Utilizzando ICOS-Ig come stimolo maturativo si differenziano invece DC mature in grado di indurre un aumento solo nella secrezione dell'IFN- γ (DC basale vs DC ICOS-Ig: IFN- γ 12.1 ± 5.9 vs 45.8 ± 15.1 pg/ml). Il dosaggio delle citochine presenti nei surnatanti delle coculture di linfociti T e DC maturate in presenza della combinazione LPS/ICOS-Ig ha rivelato un aumento nella secrezione di IFN- γ con dosaggi confrontabili con quelli ottenuti in presenza di DC stimulate con ICOS-Ig da solo, e di IL-10.

Anche gli MDM maturati in presenza di LPS inducono, come le DC, la secrezione durante MLR, di alte dosi di IFN- γ , IL-2 ed IL-5 rispetto a quelle dosate nei surnatanti di linfociti T stimolati con MDM basali (MDM basali vs MDM LPS: IFN- γ 8.0 ± 1.3 vs 241.5 ± 59.4 pg/ml; IL-2 9.8 ± 4.0 vs 22.6 ± 9.6 pg/ml; IL-5 2.4 ± 0.3 vs 16.4 ± 5.0 pg/ml). Utilizzando ICOS-Ig come stimolo maturativo invece si ottengono degli MDM che non inducono aumenti nel

dosaggio di nessuna delle citochine testate rispetto ai valori basali. La combinazione LPS/ICOS-Ig permette di avere degli MDM capaci di stimolare un' aumentata secrezione di IL-10 da parte dei linfociti T helper rispetto ai valori dosati in condizioni basali (figure 21-22)

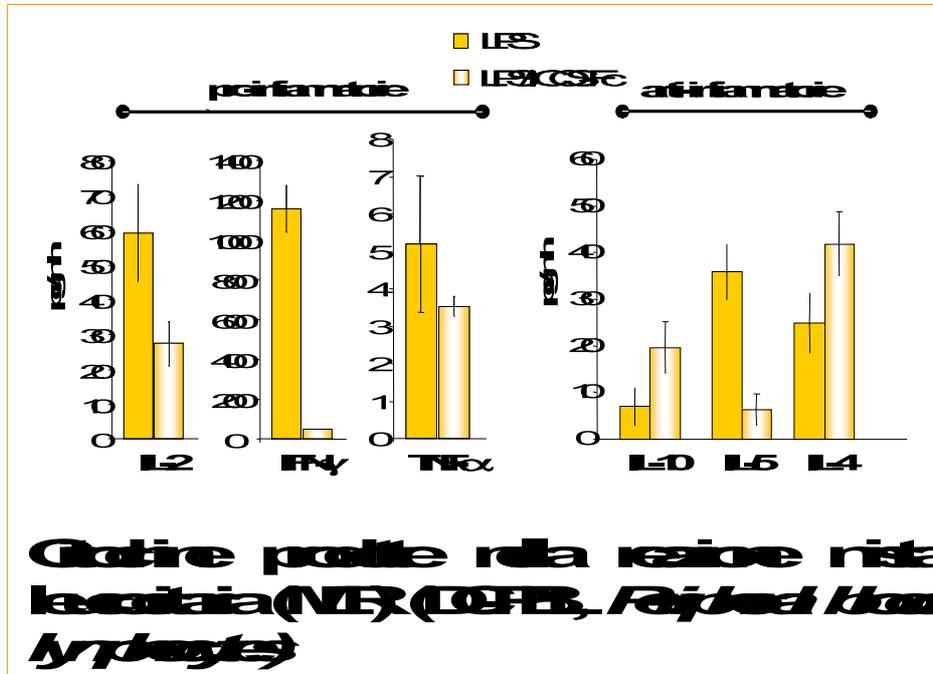


Figura 21 Citochine prodotte durante MLR DC-PBL (sono riportate solo le citochine i cui livelli variavano significativamente in presenza di ICOS-Ig).

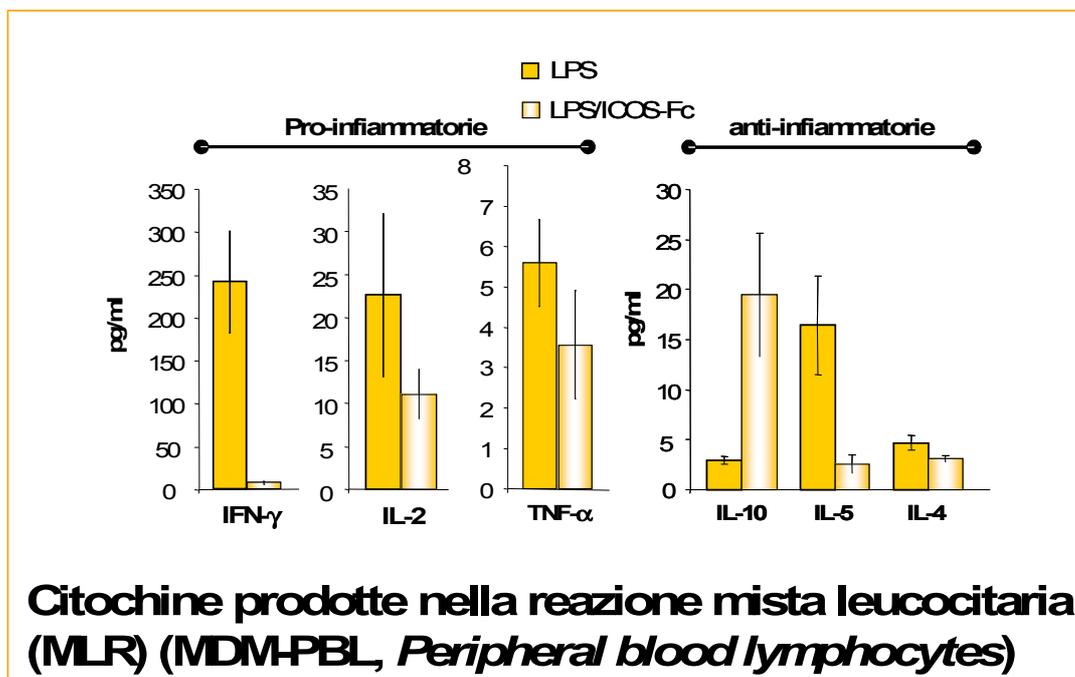


Figura 22 Citochine prodotte durante MLR MDM-PBL (sono riportate solo le citochine i cui livelli variavano significativamente in presenza di ICOS-Ig).

Risultati 2 - LINFOCITI B

1. Resa dell'estrazione da tonsille

Gli esperimenti sono stati condotti sulle tonsille di 25 pazienti pediatrici, sottoposti a tonsillectomia negli ospedali G.Gaslini di Genova e Maggiore della Carità di Novara.

Rispetto alle cellule mononucleate totali estratte, i linfociti B ottenuti rappresentano mediamente il 70% (mediana 68%: figura 23)

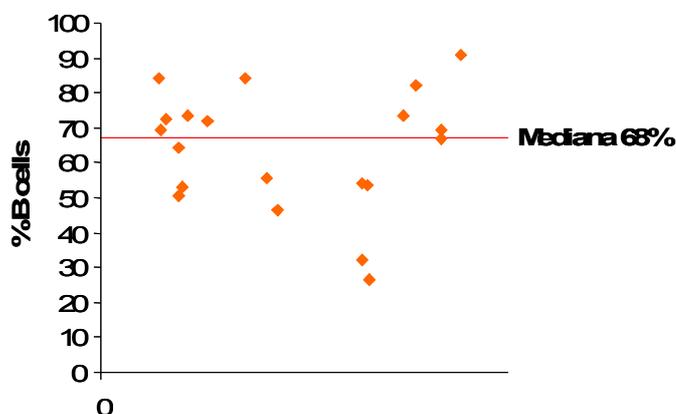


Figura 23 Linfociti B presenti in tonsille di pazienti pediatrici (valori calcolati in riferimento alle cellule mononucleate totali).

Le sottopopazioni utilizzate per gli esperimenti sono risultate però molto meno rappresentate. I valori della mediana delle 3 sottopopolazioni rispetto ai linfociti B totali sono i seguenti:

- GC: mediana 3,01%
- FM: mediana 0,55%
- SE "resting": mediana 3,97%

Le cellule presenti in maggior quantità sono risultate quelle dello strato sottoepiteliale attivate, che però non sono state prese in considerazione nei nostri esperimenti, nei quali abbiamo preferito utilizzare cellule "resting", cioè non attivate.

2. Caratterizzazione immunofenotipica

Per valutare la purezza delle sottopopolazioni isolate è stata valutata l'espressione, mediante analisi citofluorimetrica, di alcuni marcatori caratteristici.

CD19 è espresso da tutti i linfociti B. Le cellule del centro germinativo sono caratterizzate da un'elevata espressione di CD10 e CD38, nonché delle molecole MHC di classe II, come tutte le APC professioniste (Figura 24).

GC	CD9	CD10	CD38	HADR	CD3	CD3
(% di cellule positive)	89,87,73	80,53,62	87,33,21,81	98,41,0,75	4,02,2,6	1,06,0,35

Figura 24 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule del centro germinativo (GC)

Le cellule quiescenti dello strato sottoepiteliale e del mantello follicolare si differenziano e vengono separate in base all'espressione del marcatore CD5, caratteristico delle seconde (Figura 25).

SE	CD9	CD5
(% di cellule positive)	79,37±10,13	13,91±7,62

FM	CD5
(% di cellule positive)	8,88±3,0

Figura 25 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule dello strato sottoepiteliale e del mantello follicolare

3. Espressione di B7h

In uno studio preliminare ho valutato in che modo gli stimoli che avrei utilizzato nei successivi esperimenti influenzassero l'espressione di B7h, il recettore di ICOS-Ig.

I tempi ottimali di incubazione con tali stimoli sono risultati di 24 ore per le GC, che per loro natura tendono ad andare spontaneamente in apoptosi, e di 48 ore per SE ed FM.

L'espressione di B7h risulta fortemente aumentata da SAC e PMA, sia da soli che associati ad IL-2 in tutte le sottopopolazioni studiate (Figure 26-27).

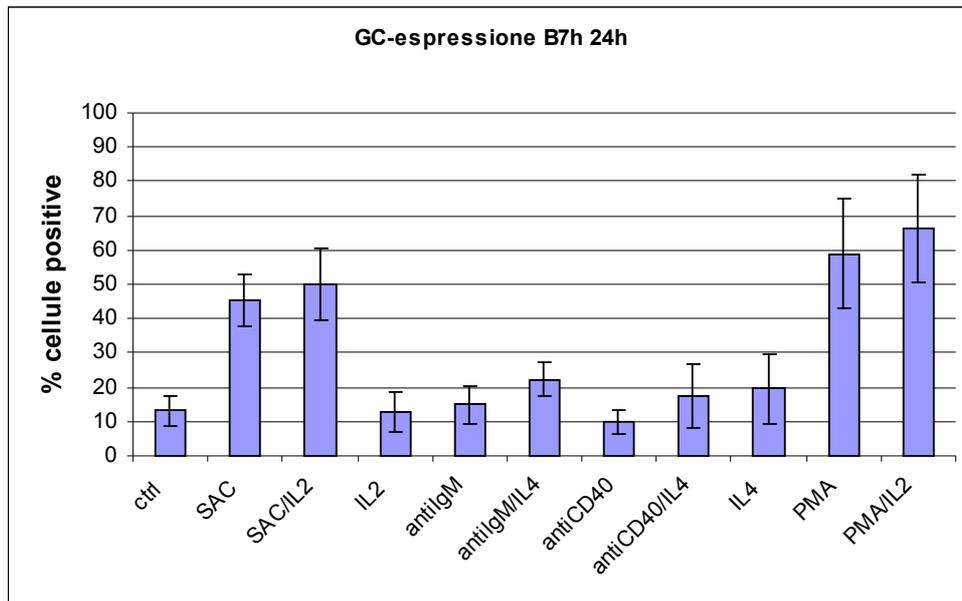


Figura 26 Livelli di espressione di B7h in GC

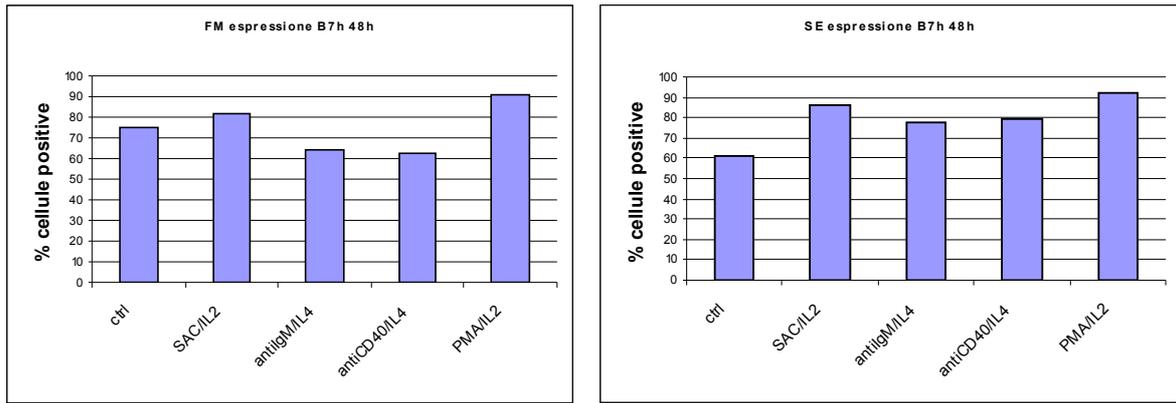


Figura 27 Livelli di espressione di B7h in FM e SE

4. Effetti della stimolazione di B7h sulla proliferazione linfocitaria

La stimolazione di B7h tramite ICOS-Ig ha dimostrato di indurre una significativa diminuzione della proliferazione di linfociti B delle tre sottopopolazioni attivati con SAC e SAC+IL-2. Risultati variabili sono stati invece ottenuti nel caso di cellule trattate con altri stimoli quali anti-CD40, anti-IgM e PMA, da soli o in associazione alle citochine IL-2 e IL-4. Gli effetti marcati e ripetibili ottenuti su cellule stimolate con SAC e SAC+IL2 sembrano essere in accordo con il marcato aumento di espressione di B7h indotto da tali stimoli

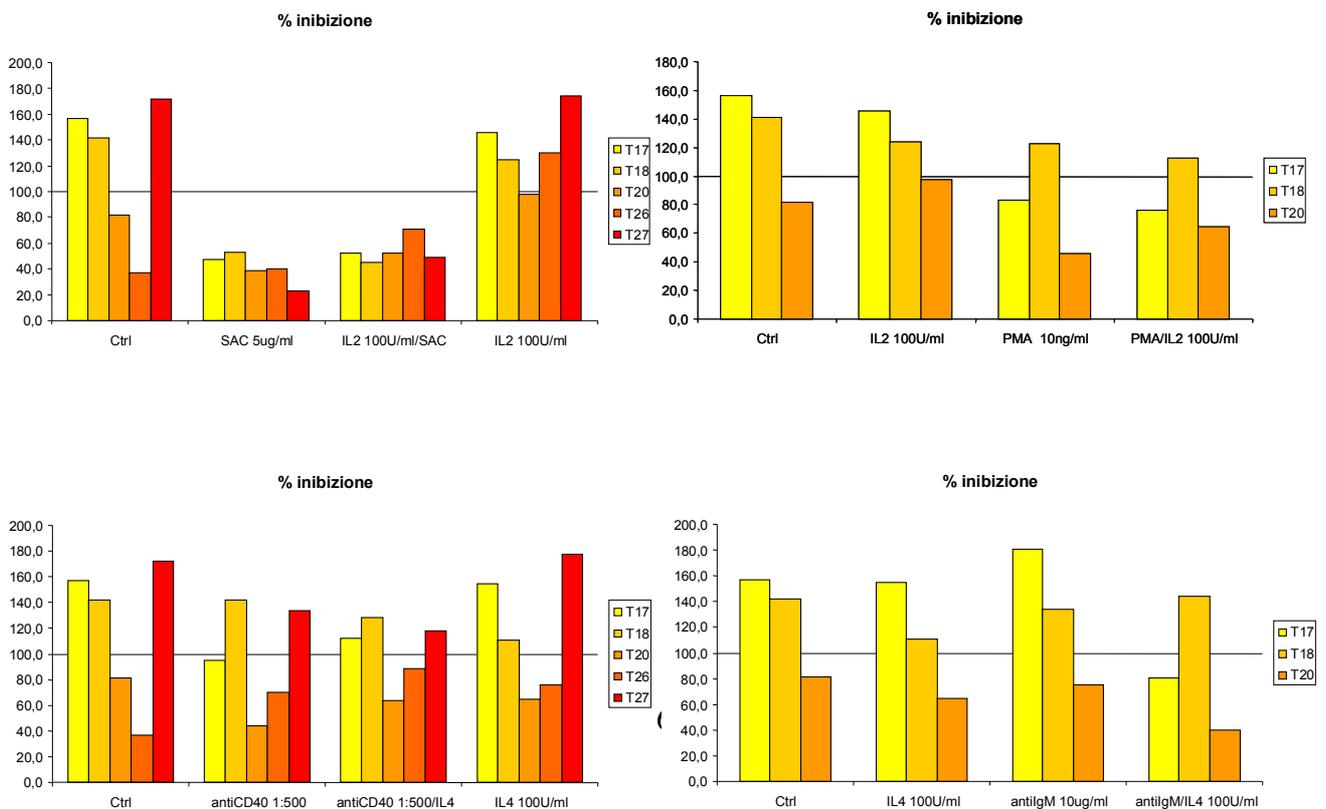


Figura 28 Effetti della stimolazione di B7h sulla proliferazione di GC indotta da vari stimoli (i risultati sono espressi come percentuale di inibizione della proliferazione del trattato con ICOS-Ig rispetto al non trattato)

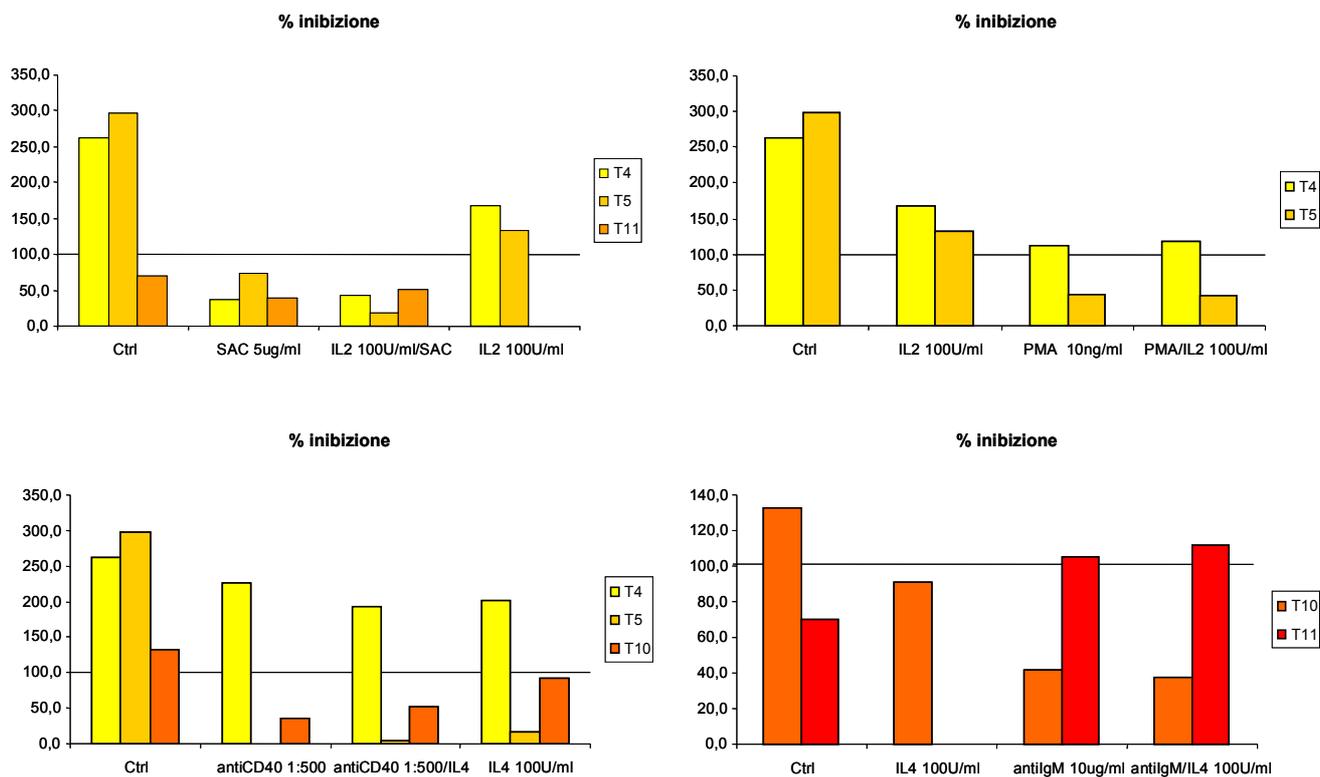


Figura 29 Effetti della stimolazione di B7h sulla proliferazione di SE indotta da 48 ore di incubazione con i diversi stimoli indicati (i risultati sono espressi come percentuale di inibizione della proliferazione del trattato con ICOS-Ig rispetto al non trattato)

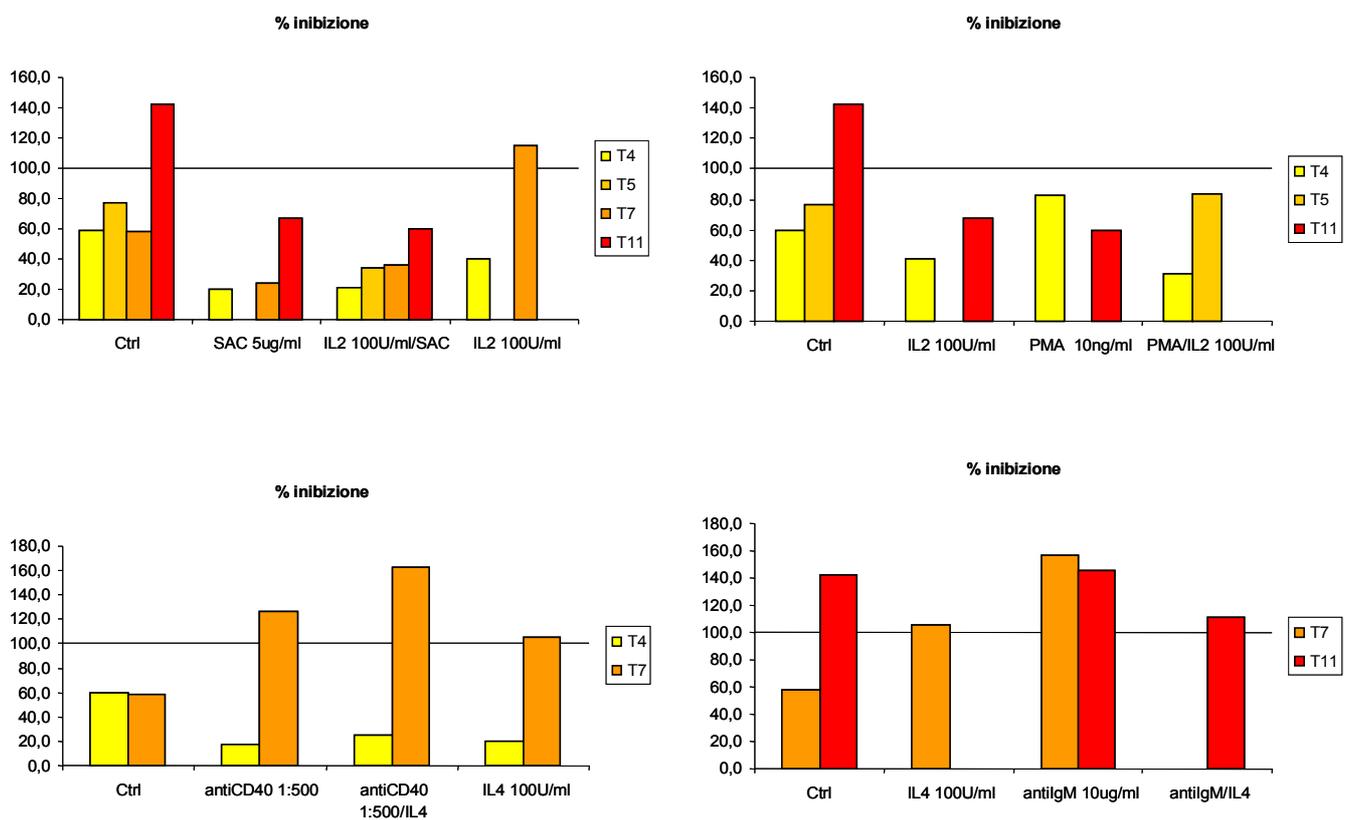


Figura 30 Effetti della stimolazione di B7h sulla proliferazione di FM indotta da 48 ore di incubazione con gli stimoli indicati (i risultati sono espressi come percentuale di inibizione della proliferazione del trattato con ICOS-Ig rispetto al non trattato)

5. Effetti sull'apoptosi

Gli effetti della stimolazione di B7h sull'apoptosi nelle tre sottopopolazioni è stato valutato tramite analisi citofluorimetrica dopo colorazione con annessina V e ioduro di propidio (PI). Non sono state osservate variazioni significative nè in termini di induzione, nè in termini di protezione dalla morte apoptotica in nessuna delle tre sottopopolazioni studiate. Nelle figure 31÷33 sono indicate le percentuali di cellule suddivise in 4 quadranti in base alla positività ai coloranti usati (annexina V: positività nei quadranti UR e LR; PI: positività nei quadranti UL e UR). Sono stati riportati 4 esperimenti significativi (T11 e T6 per le GC; T11 per le SE e per le FM). Si è scelto di trattare tutte le sottopopolazioni per 24 ore con gli stimoli indicati, perchè è risultato il tempo ottimale per studiare tale fenomeno.

T14	Ctrl	ICOS	AntiCD40/IL4	AntiCD40/IL4ICOS	PMA/IL2	PMA/IL2/ICOS				
UL	2,9	1,37	0,93	1,19	1,49	6,35				
UR	38,71	29,99	34,66	22,61	36,52	34,2				
LL	27,71	21,54	25,79	31,89	41,39	35,04				
LR	30,67	47,1	38,63	44,31	20,6	24,4				
T6	Ctrl	ICOS	SAC	SAC/ICOS	SAC/IL2	SAC/IL2/ICOS	antiIgM	antiIgM/ICOS	antiIgM/IL4	antiIgM/IL4/ICOS
UL	29,03	34,98	22	32,37	15,87	29,52	18,37	27,75	12,84	22,79
UR	33,48	15,5	22,29	18,55	27,74	19,19	34,7	18,35	29,98	18,42
LL	25,96	42,42	45,48	40,24	42,55	39,34	26,18	38,97	28,69	43,74
LR	11,53	7,1	10,23	8,84	13,84	11,96	20,75	14,93	28,48	15,05

Figura 31 Effetti della stimolazione di B7h sull'apoptosi di GC dopo 24 ore di incubazione con gli stimoli indicati.



Figura 32 Effetti della stimolazione di B7h sull'apoptosi di SE dopo 24 ore di incubazione con gli stimoli indicati.

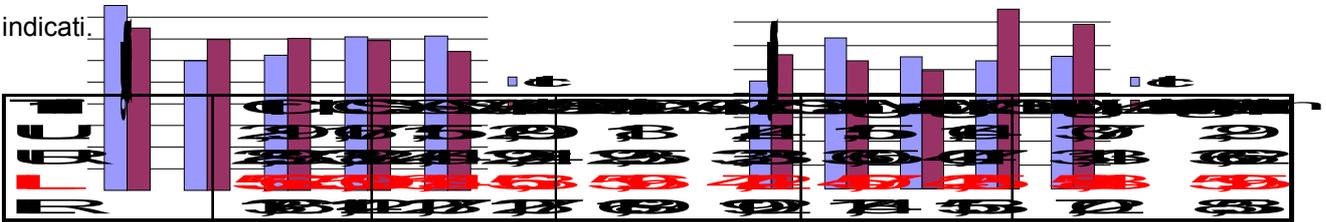


Figura 33 Effetti della stimolazione di B7h sull'apoptosi di FM dopo 24 ore di incubazione con gli stimoli indicati.

6. Effetti della stimolazione di B7h sul differenziamento dei linfociti B

Per valutare gli effetti della stimolazione di B7h sul differenziamento di GC, SE e FM è utile determinare in che misura la presenza di ICOS-Ig possa influenzare la produzione dei vari isotipi anticorpali e in particolare di IgG e IgM. Per valutare la produzione di IgG è necessario ottimizzare una metodica che permetta di evitare una sovrastima dovuta alla presenza di ICOS-Ig nei surnatanti raccolti. ICOS-Ig infatti è una proteina ricombinante contenente il frammento Fc delle IgG di classe I. Per ora sono quindi state dosate soltanto le IgM nei surnatanti raccolti dopo 5 giorni di coltura in presenza degli stimoli indicati in figure 34÷36. ICOS-Ig sembra non influenzare in modo significativo la produzione di IgM da parte di GC. Sembra invece diminuirne i livelli in SE ed FM stimolati con SAC e SAC/IL2. Questo potrebbe voler dire che ICOS-Ig, in associazione a tali stimoli è in grado di indurre switch isotipico. E' però necessario confermare con altri esperimenti la ripetibilità di tali risultati e valutare parallelamente l'influenza su altri isotipi anticorpali. Sono stati indicati singoli esperimenti rappresentativi.

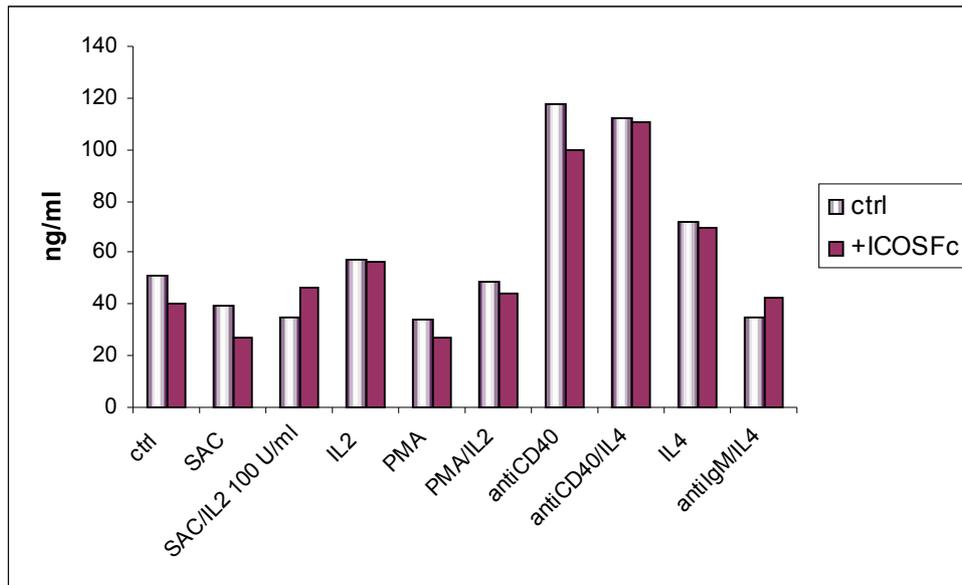


Figura 34 Effetti della stimolazione di B7h sulla produzione di IgM da parte di GC.

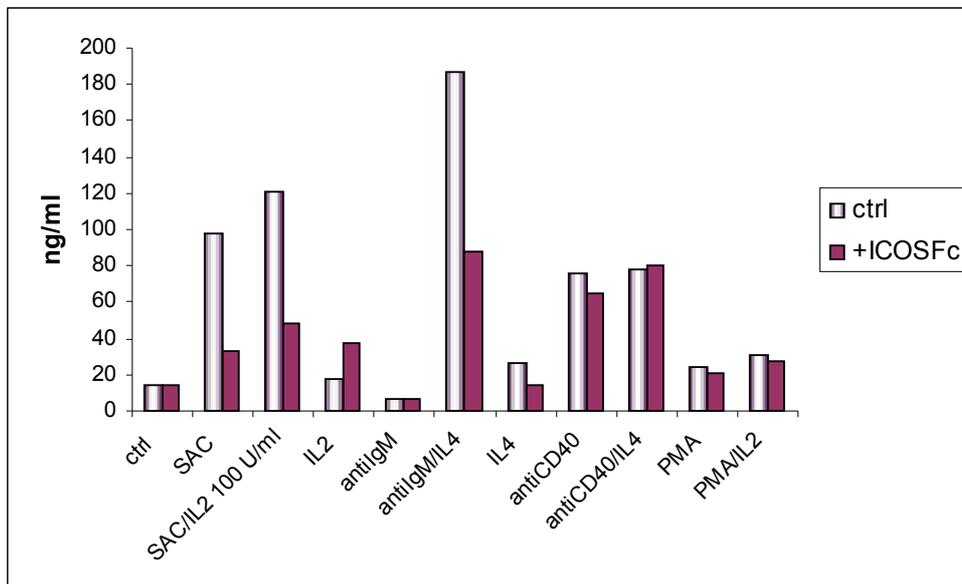


Figura 35 Effetti della stimolazione di B7h sulla produzione di IgM da parte di SE.

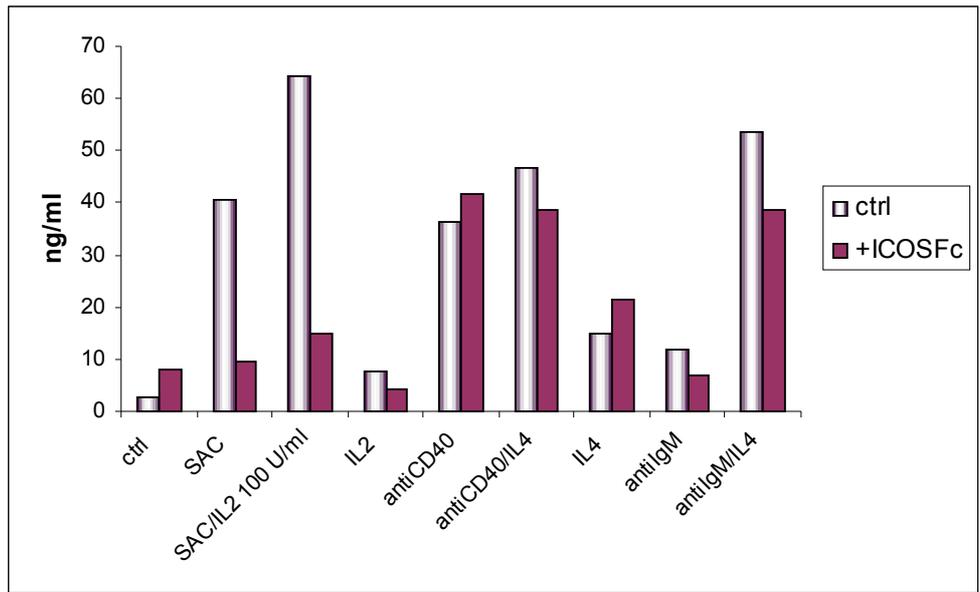


Figura 36 Effetti della stimolazione di B7h sulla produzione di IgM da parte di FM.

Bibliografia

Acuto, O., and D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu.Rev. Immunol.*

Aicher A., Hayde-Ledbetter M., Brady W.A., Pezzutto A., Richter G., Magaletti D., Buckwalter S., Ledbetter J.A. and ClarkE.A., 2000. Characterization of human Inducible Costimulator Ligand expression and function. *The Journal of Immunology*, 164: 4689-4696

Bretscher P.A. A two step, two signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc.Natl. Acad Sci USA* 96, 185-190 (1999)

Brunelleschi S, Penengo L, Lavagno L, Santoro C, Colangelo D, Viano I, Gaudino G. 2001. Macrophage stimulating protein MSP evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin. *Br. J. Pharmacology*, 134, 1285-1295

Buonfiglio D., Bragardo M., Redoglia V., Vaschetto R., Bottarel F., Bonisconi S., Bensi T., Mezzatesta C., Janeway jr. C.A. and Dianzani U. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 3463–3467.

Buonfiglio,D, Bragardo M, Bonisconi S, Redoglia V, Cauda R, Zupo S, Burgio VL, Wolff H, Franssila K, Gaidano G, Carbone A, Janeway CA jr, and Dianzani U. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eu J Immunol.* 1999. 29:2863-74.

Chambers, C. A., and J. P. Allison. Costimulatory regulation of T cell function. 1999. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:203-210.

Coyle, a.J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Ngyen, T.Burwell, H. Schneider, J.A. Gonzalo, M. Gosselin, L.R. Owen, C.E. Rudd, and J.C. Gutierrez-Ramos. 2000. The CD28-related molecules ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13:95-105

Dianzani U, and Malavasi F. Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit Rev Immunol.* 1995. 15:167-200.

Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R. & Brown, P.O. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:11796-11801.

Dong C., Temann U.A. and Flavell R.A., 2001. Critical role of Inducible Costimulator in germinal center reactions. *The Journal of Immunology*

Dustin ML and Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science.* 1999.283:649-50.

Dono M., Zupo S., Leanza N., Melioli G., Fogli M., Melagrana A., Chiorazzi N. and Ferrarini M., 2000. Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. *The journal of immunology*, 164: 5596-5604.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. 2003. *Nat. Immunol.* 4:1206-12.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. 2000. *J. Exp. Med.* 192:1027-34.

Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1236-43.

Goldsby R.A, Kindt T.J., Osborne B.A. *Kuby Immunology.* 2000. 1: 11-12; 2: 39-46.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. 2002. *Nat. Immunol.* 3:1097-101.

Harding FA, McArthur JG, Gross A, Raulet DH, and Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 1992. 356:607-9.

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999. 397:263-66.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. 1992. *EMBO J*. 11:3887-95.

James L. Riley, Patrick J. Blair, John T. Musser, Ryo Abe, Katsunari Tezuka, Takashi Tsuji, and Carl H. June.] ICOS Costimulation Requires IL-2 and Can Be Prevented by CTLA-4 Engagement. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 4943–4948.

Janeway CA jr, and Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte response. *Cell*. 1994. 76:275-85.

Janeway CA jr, and Golstein P. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr. Opin. Immunol*. 1993. 5:313-23.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, et al. PDL2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. 2001. *Nat. Immunol*. 2:261-68.

Liang L., Porter E.M. and Sha W.C., 2002. Constitutive expression of the B7h ligand for Inducible Costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and IL4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J.Exp.Med* 196 (1) 97-108.

Ling, V., Wu, P. W., Finnerty, H. F., Bean, K. M., Spaulding, V., Fouser, L. A., Leonard, J. P., Hunter, S. E., Zollner, R., Thomas, J. L., Miyashiro, J. S., Jacobs, K. A. and Collins, M., Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol*. 2000. 164: 1653–1657.

McAdam A.J., Greenwald R.J., Levin M.A., Chernova T., Malenkovich N., Ling V., Freeman G.J. and Sharpe A.H., 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class-switching. *Nature* 49: 102-105.

Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. 2004. *J.Immunol.* 172:4100-10.

Nurieva RI, Duong J, Kishikawa H, Dيازاني U, Rojo JM, Ho I, Flavell RA, Dong C. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity.* 2003 Jun;18(6):801-11.

Peggs Karl S. and James P. Allison. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. 2005. *British Journal of Haematology.*139:809-824.

Prasad, K. V. S., Cai, Y.-C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S. E. and Rudd, C. E., T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994. 91: 2834–2838.

Redoglia V, Diazani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonisconi S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur J Immunol.* 1996. 26: 2781-89.

Riley, J.L., Mao, M., Kobayashi, S., Biery, M., Burchard, J., Cavet, G., Gregson, B.P., June, C.H. & Linsley, P.S. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:11790-11795.

Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 coreceptor signalling. 2003. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 544-56.

Schneider H, Prasad KV, Shoelson SE, Rudd CE. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells.1995. *J Exp Med.* 181(1):351-5.

Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V., Shoelson, S.E., and Rudd, C.E. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. 1995. *Eur. J. Immunol.* 4:1044-1050.

Schwartz, J.C., X. Zhang, A.A. Federov, S.G. Nathenson, S.C. Almo. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. 2001. *Nature* 410: 604-608.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-26.

Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, et al. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. 2001. *J. Immunol.* 166:5480-87.

Stamper, C.C., Y. Zhang, J.F. Tobin, D.V. Erbe, S. Ikemizu, S.J. Davis, M.L. Stahl, J. Seehra, W.S. Somers, Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. 2001. *Nature* 410: 608-611.

Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity.* 1997. 7:445-50.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. 1995. *Immunity.* 3:541-547.

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. 2001. *J.Exp. Med.* 193:839-46.

Vibhakar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T lymphocytes. 1997. *Exp. Cell. Res.* 232:25-28.

Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocytes costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* 1999. 283:680-82.

Viola, A. and Lanzavecchia, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. 1996. *Science*. 73:104-106.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. 1994. *Immunity*.1: 405-413.

Wang S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, J. Bajorath. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. 2002. *J. Exp. Med.* 195: 1033-1041.

Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang JF, Fallarino F, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. 2003. *Nat. Immunol.* 4:670-79.

Watts TH and DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Cur Opin Immunol* .1999, 11:286-93

Xavier R. and Seed B. Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol*. 1999. 11:265-269.

Yagi J, Arimura Y, Dianzani U, Uede T, Okamoto T, Uchiyama T .Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):783-94.

Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliot GS, Hiu A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*.1999. 402:827-32.

Zhang XW, Schwartz JCD, Guo XL, Bhatia S, Cao EH, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. 2004. *Immunity*. 20:337-47.

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA 2005-2006:

Seminari seguiti:

- 18 Novembre 2005 Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits
Dr. D. Cotella
- 23 Novembre 2005 HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications
Prof. L. Adinolfi
- 25 Novembre 2005 Mechanism of transcriptional regulation and disease
Prof. R. Tjian
- 20 Aprile 2006 Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative
Dr.ssa D. Cilloni
- 03 Maggio 2006 Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute
Dr. C. Jommi
- 04 Maggio 2006 Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale
Dr. L. Mutti
- 15 Maggio 2006 Strategies to maintain oral food intake in patients with malignant disease: success and failures
Prof. V. Baracos
- 18 Maggio 2006 L'epatite autoimmune
Prof. M. Lenzi
- 30 Maggio 2006 Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni
Prof.ssa M. Lavitrano
- 15 Giugno 2006 Melusin: a stretch sensor molecule controllino adaptive cardiac remodeling to pressue overload
Prof. G. Tarone
- 27 Giugno 2006 Osteointegrazione e superfici implantari
Prof.ssa L. Rimondini
- 05 Luglio 2006 DNA and protein arrays in infection disease: from basic research to vaccine design
Dr.ssa R. Grifantini
- 11 Settembre 2006 The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis
Dr. D. Brömme
- 29 Settembre 2006 La rete di regolazione delle attività anti-angiogeniche degli interferoni

Prof. Ulrich Pfeffer

Partecipazione a Congressi Nazionali:

XXVIII Congresso Nazionale SIP 2006: Pavia, 19-22 settembre 2006

Presentazione in forma di poster del seguente lavoro:

EFFETTI DELL'INTERAZIONE ICOS/B7h SULLE APC

Seren-Bernardone I.¹, Nicola S.¹, Chiocchetti A.¹, Mesturini R.¹, Castelli L.¹, Ferretti M.¹, Zupo S.² e Dianzani U.¹

¹IRCAD e Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Novara

²SS Diagnostica delle malattie linfoproliferative, IST, Genova

Pubblicazioni:

1. Bardelli C, Gunella G, Varsaldi F, Balbo P, Del Boca E, **Seren-Bernardone I**, Amoruso A, Brunelleschi S. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-kB pathway. *British Journal of Pharmacology*; 2005 1-12
2. Mesturini R., Nicola S., Chiocchetti A., **Seren-Bernardone I.**, Castelli L., Bensi T., Ferretti M., Comi C., Dong C., Rojo J.M., Yagi J., and Dianzani U., 2006 *ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN- γ and modulates activation of human naïve CD4+ T cells. In press*