

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



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

**Relazione 3°anno:
Studio degli effetti sulle APC
dell'interazione ICOS/B7h**

Responsabile scientifico:
Prof. Umberto Dianzani
Dottoranda:
Ilaria Seren-Bernardone

SEZIONE I

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 aminoterminale, 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 amminoacidi, 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 (CD278) 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 I κ B (IL-2 inducibile 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 monomeric, 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**).

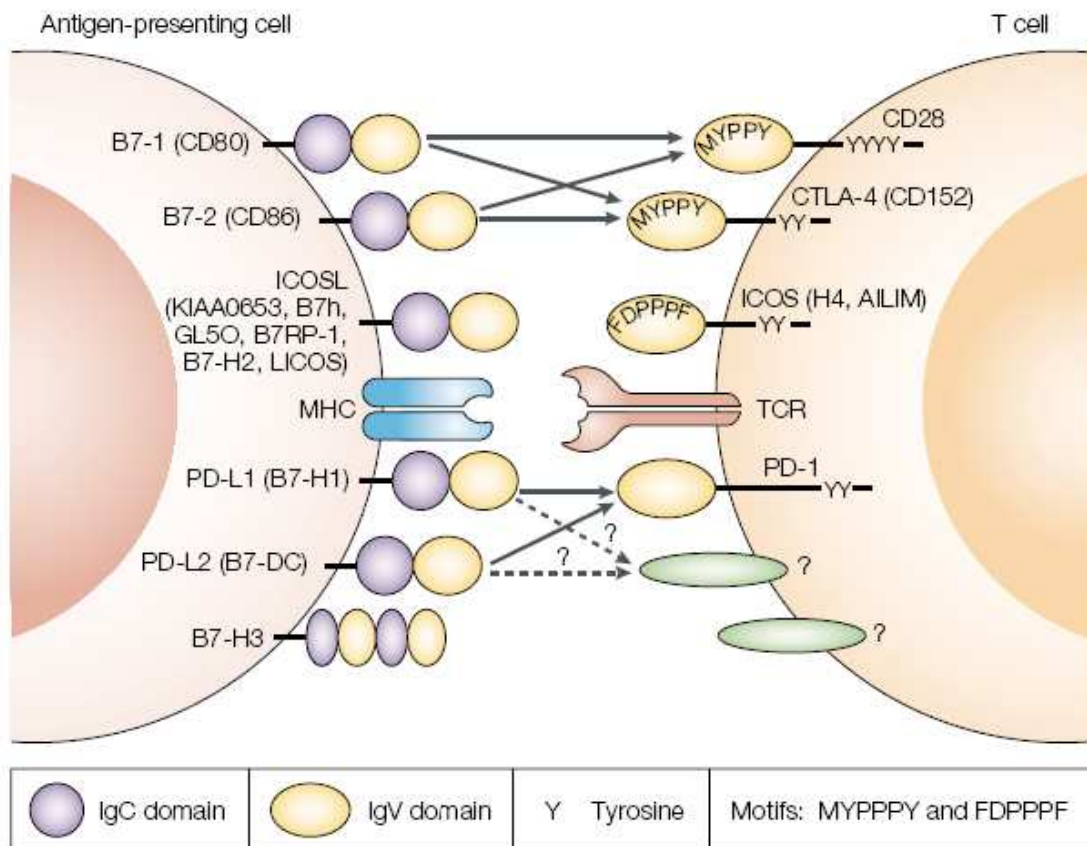


Figura 1 Rappresentazione schematica delle famiglie B7 e CD28; (da Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-26.).

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 (**figura 2**).

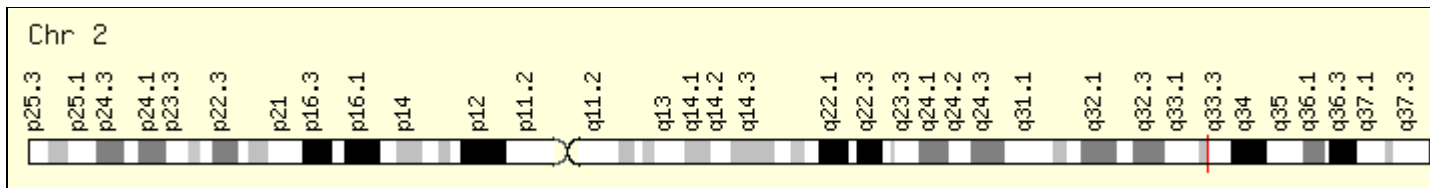


Figura 2 Localizzazione cromosomica di H4/ICOS

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 linfocine, 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'innescio 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 ad una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Il linfocita è così in grado di riconoscere il frammento antigenico presentato dalla APC (**figura 3**).

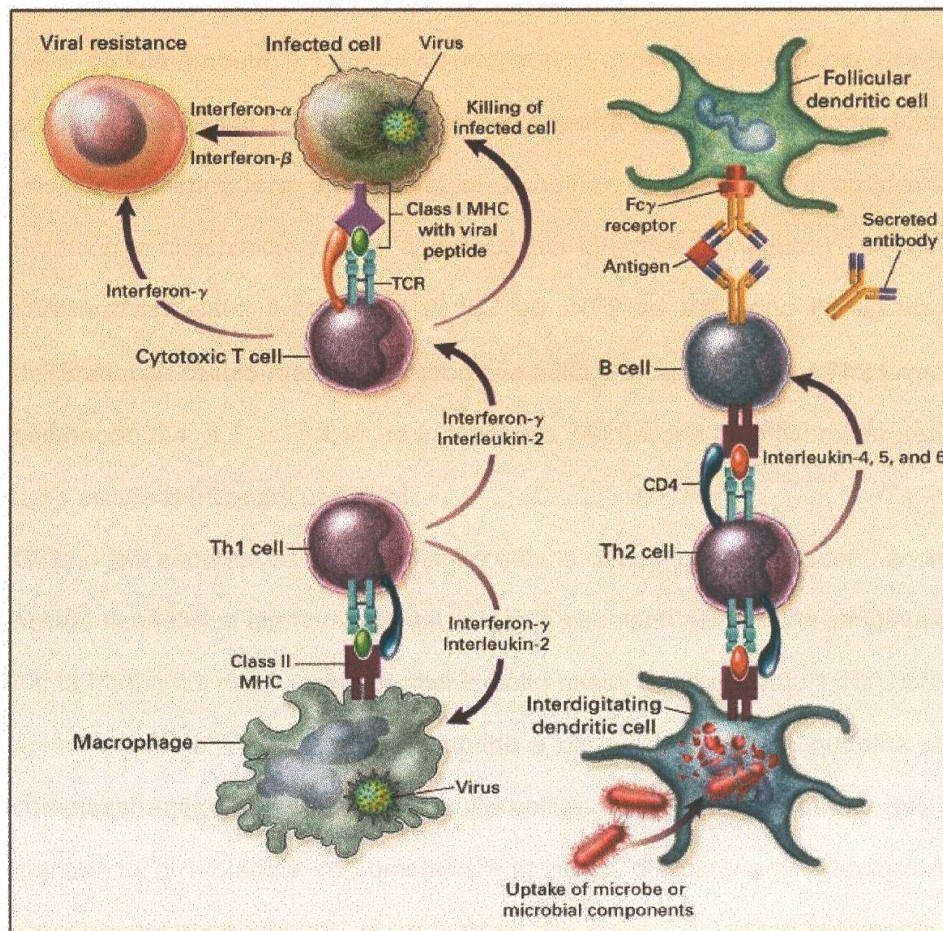


Figura 3 Schematizzazione delle risposte immunitarie cellulo-mediata ed umorale e dell'interazione delle APC con i linfociti T.

2.1 I linfociti B

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 DE. 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.

2.1.1 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 stipe 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 4**).
- **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.

2.1.2 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 verificerebbe 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.

2.1.3 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*).

2.1.4 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 4**).

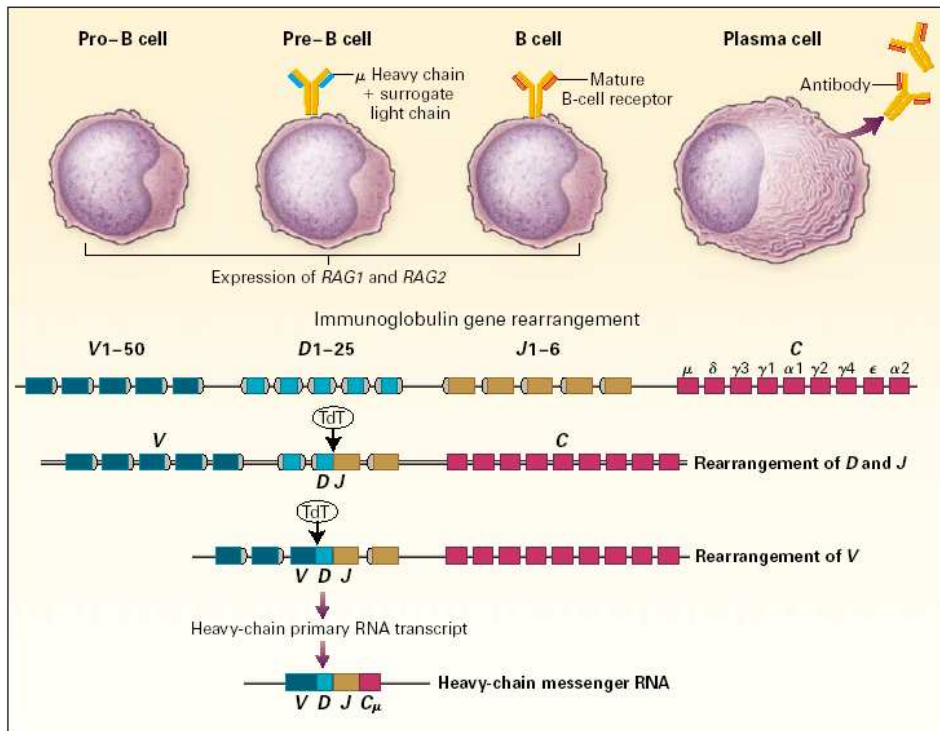


Figura 4 Riarrangiamento genico delle Immunoglobuline [Delves et al., review, 2000, The immune system]

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 all'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 dallo 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.

2.1.5 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 antigene 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 risponde al medesimo antigene (riconoscimento associato). Occorre, quindi, affinché vengano prodotti anticorpi specifici per un determinato patogeno, che una linfocita CD4 specifico sia attivato da una APC (cellula presentante l'antigene) e interagisca con un linfocita B che ha legato sulle proprie sIg 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.

2.1.6 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.

2.1.7 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. Cosicché 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 stanziavano 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 slg, 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 mia attenzione è stata focalizzata su 3 sottopopolazioni di linfociti B estratti da tonsille, un comune modello di organo linfoide secondario, ovvero i linfociti B del centro germinativo (GC), quelli del mantello follicolare (FM) e quelli dello strato sottoepiteliale (SE). Per ragioni di resa si è scelto di studiare FM e SE non attivate come un'unica popolazione, definita "*resting*", poiché costituita da cellule quiescenti (naive e della memoria), in contrapposizione alle GC, che sono instato di attivazione.

La regione sottoepiteliale 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), ma è possibile e agevole separare isolare le cellule quiescenti grazie alla diversa densità/dimensione.

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 5**) [Dono et al., 2000].

I marcatori di superficie presi in considerazione per distinguere tali sottopopolazioni sono i seguenti [Dono et al, 2000]:

- *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.

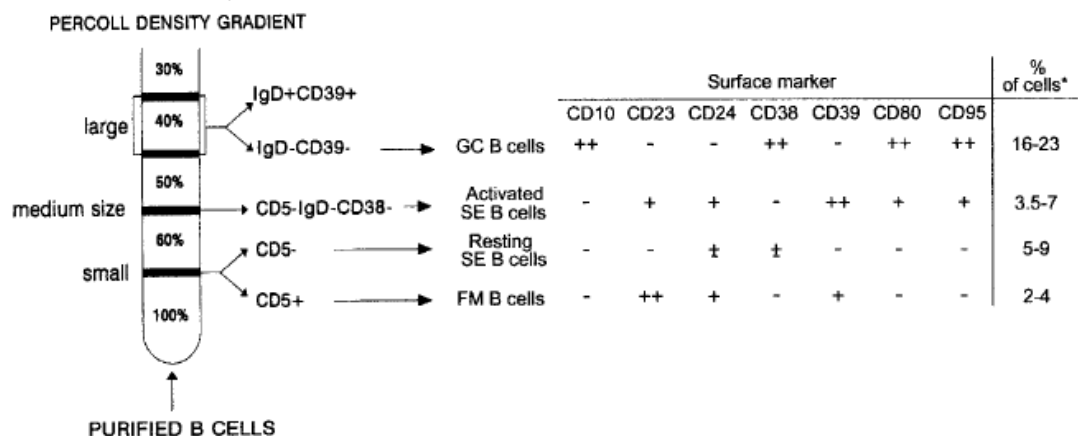


Figura 5 Sottopopolazioni di linfociti B estratte da tonsille e sottoposte a centrifugazione in gradiente di Percoll (le percentuali sono riferite ai linfociti B totali).

2.2 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.

2.2.1 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.

2.2.2 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

2.2.2.1 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 $IFN\gamma$. La sua espressione in tessuti non linfoidi non è del tutto chiara [Aicher et al., 2000].

2.3 Fc receptor

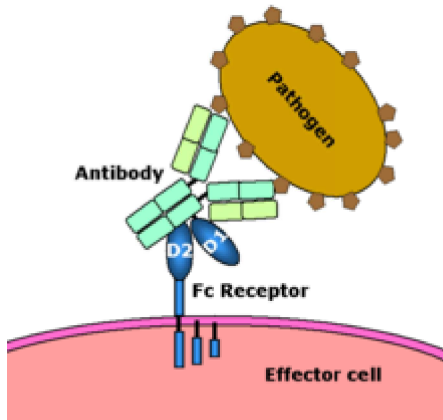


Figura 6 Il recettore per Fc

I recettori per i frammenti Fc delle Ig sono espressi sulla superficie di numerosi tipi di cellule (NK, macrofagi, neutrofili, mast-cellule, DC, linfociti B...). Essi legano anticorpi legati a cellule infettate o a patogeni e hanno la funzione di stimolare le cellule fagocitiche e citotossiche a distruggere tali patogeni (**figura 6**).

2.3.1 Classi di Fc-receptor

Gli Fc-receptors vengono classificati in base al tipo di anticorpo che riconoscono: $Fc\gamma R$ (IgG), $Fc\alpha R$ (IgA), $Fc\epsilon R$ (IgE) e $Fc\alpha\mu R$ (IgM e IgA). Gli $Fc\gamma R$ sono i piu' importanti e appartengono alla superfamiglia delle Ig. Sono $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32), $Fc\gamma RIIB$ (CD32), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a) e $Fc\gamma RIIB$ (CD16b) e differiscono per affinità e struttura. Alla famiglia degli $Fc\alpha R$ appartiene solo CD89 ($Fc\alpha RI$). Gli $Fc\epsilon R$ sono $Fc\epsilon RI$ (ad alta affinità) e $Fc\epsilon RII$ (a bassa affinità) (**tabella 1**).

Receptor name	Principal antibody ligand	Affinity for ligand	Cell distribution	Effect following binding to antibody
<u>FcγRI (CD64)</u>	IgG1 and IgG3	High (Kd ~ 10^{-9} M)	Macrophages Neutrophils Eosinophils Dendritic cells	Phagocytosis Cell activation Activation of respiratory burst Induction of microbe killing
<u>FcγRIIA (CD32)</u>	IgG	Low (Kd > 10^{-7} M)	Macrophages Neutrophils Eosinophils Platelets Langerhans cells	Phagocytosis Degranulation (eosinophils)
<u>FcγRIIB1 (CD32)</u>	IgG	Low (Kd > 10^{-7} M)	B Cells Mast cells	No phagocytosis <u>Inhibition of cell activity</u>
<u>FcγRIIB2</u>	IgG	Low (Kd > 10^{-7} M)	Macrophages	Phagocytosis

(CD32)		M)	Neutrophils Eosinophils	Inhibition of cell activity
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	Low (Kd > 10 ⁻⁶ M)	NK cells	Induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	Low (Kd > 10 ⁻⁶ M)	Eosinophils Macrophages Neutrophils Mast cells Follicular dendritic cells	Induction of microbe killing
FcεRI	IgE	High (Kd ~ 10 ⁻⁷ M)	Mast cells Eosinophils Basophils Langerhans cells	Degranulation
FcεRII (CD23)	IgE	Low (Kd > 10 ⁻⁷ M)	B cells Eosinophils Langerhans cells	Possible adhesion molecule
FcαRI (CD89)	IgA	Low (Kd > 10 ⁻⁶ M)	Monocytes Macrophages Neutrophils Eosinophils	Phagocytosis Induction of microbe killing
Fcα/μR	IgA and IgM	High for IgM, Mid for IgA	B cells Mesangial cells Macrophages	Endocytosis Induction of microbe killing
FcRn	IgG		Monocytes Macrophages Dendritic cells Epithelial cells Endothelial cells Hepatocytes	Transfers IgG from a mother to fetus through the placenta Transfers IgG from a mother to infant in milk Protects IgG from degradation

Tabella 1 Classi di Fc receptor (FcR)

2.3.2 Funzione degli FcR

La funzione più comune degli Fc receptors è l'attivazione dei fagociti, ma sono coinvolti anche nella ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). FcγRI e' espresso dai granulociti ed e' coinvolto nelle reazioni allergiche poichè attiva la degranolazione.

Per quanto riguarda i linfociti B, Fc γ R può avere vari effetti, compreso quello inibitorio sulla maturazione [Bich-Thuy et al., 1982]. CD32B (Fc γ RIIB) il maggiormente espresso da questa popolazione cellulare e ha funzione inibitoria: per questo è un target per anticorpi monoclonali usati nella terapia del linfoma a cellule B [Rankin et al., 2006]. Sono frequenti polimorfismi che permettono la reattività crociata di tali recettori con IgG di topo [Holtrop et al., 1991].

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*) e in particolare sui linfociti B. E' noto che topi ICOS^{-/-} esibiscono difetti nella formazione dei centri germinativi a livello degli organi linfoidi secondari e ciò suggerisce una possibile implicazione di ICOS nella maturazione dei linfociti B [Dong et al., 2001; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001].

Mi sono quindi proposta di valutare gli effetti della stimolazione di B7h sull'attivazione di linfociti B estratti da tonsille, cercando di eliminare le interferenze dovute all'elevato numero di Fc receptor su tali cellule.

Materiali e metodi

1 Linfociti B

I linfociti B sono stati estratti da tonsille di bambini di 5-12 anni sottoposti a tonsillectomia presso 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 Preparazione delle SRBC

Le SRBC fornite dalla ditta (Oxoid) 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.

1.3 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.

1.4 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 7**).

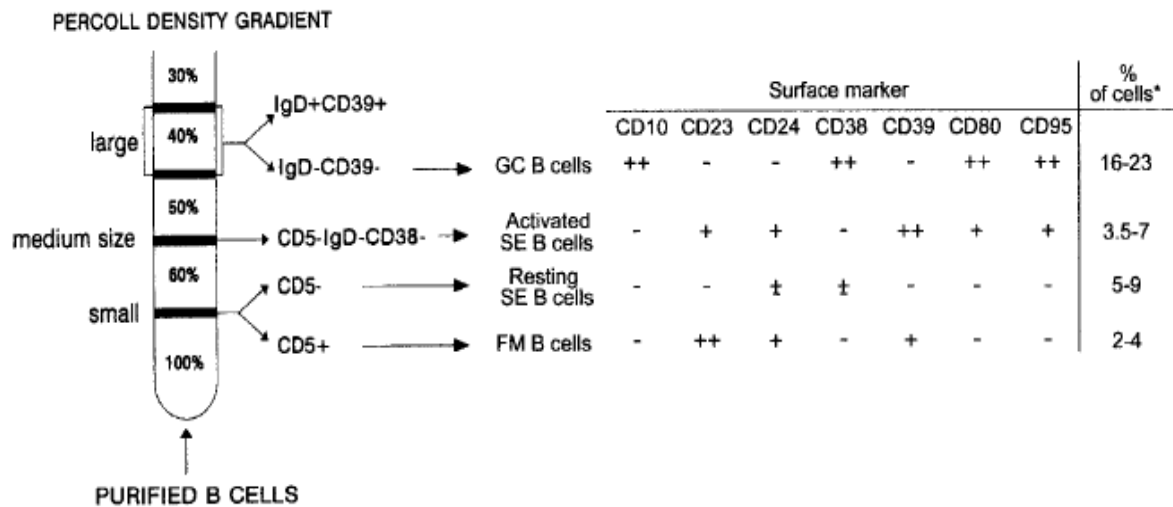


Figura 7 Sottopopolazioni presenti nei diversi anelli formati dopo centrifugazione in gradiente di densità (le percentuali si riferiscono ai linfociti B totali).

1.5 Separazione di sottopopolazioni di linfociti B tramite anticorpi monoclonali.

In figura 7 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 specifico, 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. In particolare la metodica da me utilizzata prevede l'impiego di Dynabeads Pan Mouse IgG (Dynal Biotech).

1.5.1 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 sottopitelliale (SE) e del mantello follicolare (FM).

A questo punto è possibile separare le cellule dello strato SE da quelle dello strato FM tramite colonne MACS e anticorpo anti-CD5, ma la resa in cellule CD5+ è molto bassa e ho quindi scelto di condurre gli esperimenti sulla frazione *resting* completa.

2. Caratterizzazione immunofenotipica 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:

- -anti B7h (Becton Dickinson).
- 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% FBS-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.

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).

3. Stimoli utilizzati

I linfociti B invece sono stati attivati con stimoli di diversa natura, in presenza e in assenza di costimolazione di B7h.

1. SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I, Pansorbina, Calbiochem) 5 μ g/ml;
2. IL-2 100U/ml (Sigma)
3. PMA (*phorbol myristate acetate*, Sigma) 10ng/ml;
4. J558-CD40 transfected (1:1, 1:2, 1:5): plasmacitoma murino trasfettato con CD40 umano.
5. IL-4 100U/ml (Peprotech)

4. Stimolazione di B7h

Scopo di questo anno di lavoro è stato quello di stabilire un sistema in grado di stimolare specificamente B7h sui linfociti B.

I linfociti B esprimono sulla loro superficie elevati livelli di recettori per frammenti Fc delle Ig. Per questo motivo le proteine di fusione commerciali non sono risultate adatte allo scopo in quanto, recando la coda Fc di una Ig, non permettono di discriminare gli effetti realmente dovuti alla stimolazione tramite la frazione extracellulare di ICOS da quelli dovuti all'interazione della coda Fc con i rispettivi recettori.

Inizialmente ho utilizzato la proteina di fusione ICOS-Ig (R&D), costituita dalla frazione extracellulare di hICOS fusa con la frazione Fc di una hIgG1. In parallelo le cellule sono state stimolate con un adeguato controllo (recombinant human IgG1 Fc, R&D)

In seguito ho scelto di utilizzare una proteina di fusione simile alla precedente ma con coda Fc murina (hICOS-mFc, Ancell). Anche in questo caso si e' usato un appropriato controllo (IgG2 mouse).

Per mascherare il piu' possibile la coda Fc di tali proteine ricombinanti ho provato a rivestire con esse la superficie delle Dynabeads (Invitrogen).

Infine ho condotto alcuni esperimenti di cocoltura di linfociti B e HUT78 in presenza e in assenza di ICOSFab. Le HUT78 sono linfoblasti derivati da un linfoma a cellule T ed esprimono costitutivamente ICOS in membrana. Si coltivano in RPMI 1640 supplementato con glutamina 2mM e FCS al 10%.

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

GC e *resting* sono state incubate per 5 giorni con gli stimoli precedentemente elencati in presenza e in assenza di hICOS-mIg e hICOS-hIg.

Gli effetti di tali stimoli sul differenziamento sono stati valutati misurando la produzione di immunoglobuline tramite ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). In particolare ho valutato la produzione di IgM, IgA, IgG e IgE mediante anticorpi coniugati con HRP (horseradish peroxidase) (Bethyl laboratories, USA).

Risultati

Gli esperimenti descritti si inseriscono all'interno di un progetto volto a studiare il *reverse signaling* di ICOS. Esistono infatti numerosi studi che descrivono l'effetto che la stimolazione di ICOS ha sui linfociti T in termini di attivazione e proliferazione, mentre non esistono dati sugli effetti mediati dalla stimolazione del suo controrecettore B7h sulle APC. Abbiamo quindi pensato di simulare la stimolazione di ICOS sulle principali APC in un sistema semplificato, utilizzando una proteina di fusione (commerciale) costituita dalla frazione extracellulare di ICOS e dal frammento Fc di una IgG1 umana. In questo sistema semplificato e' possibile vedere gli effetti su tali cellule mediati dal solo ICOS senza interferenze di altri sistemi recettoriali. Mentre per macrofagi e DC questo sistema e' risultato valido, per i linfociti B le interferenze dovute a legami aspecifici hanno richiesto modifiche al protocollo.

I linfociti B sono stati estratti da tonsille di pazienti pediatriche di età compresa fra i 3 e 14 anni. Non sono stati utilizzati i linfociti B presenti nel sangue periferico perchè la loro scarsa percentuale (10% dei linfociti totali) non ne permette un'estrazione a rese efficienti. Nelle tonsille invece essi costituiscono circa il 50% della popolazione cellulare ed e' possibile isolarli con metodiche abbastanza semplici e relativamente economiche. E' inoltre possibile separarli nelle varie sottopopolazioni tipiche degli organi linfoidi secondari. Inizialmente gli esperimenti sono stati condotti su 3 sottopopolazioni, ovvero i linfociti B del centro germinativo (GC), dello strato sottoepiteliale (SE) e del mantello follicolare (FM) (Relazione II anno – 2005-2006).

La resa in cellule FM è però molto bassa e talvolta insufficiente a soddisfare le condizioni sperimentali. Si è così scelto di riunire SE ed FM e di studiarle come unica popolazione, definita *resting*: infatti, a differenza del GC, formato da linfociti B attivati, gli strati SE ed FM sono prevalentemente costituiti da linfociti B quiescenti perchè naive o della memoria.

1. Resa dell'estrazione da tonsille

Gli esperimenti sono stati condotti sulle tonsille di 25 pazienti pediatriche, 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 8**)

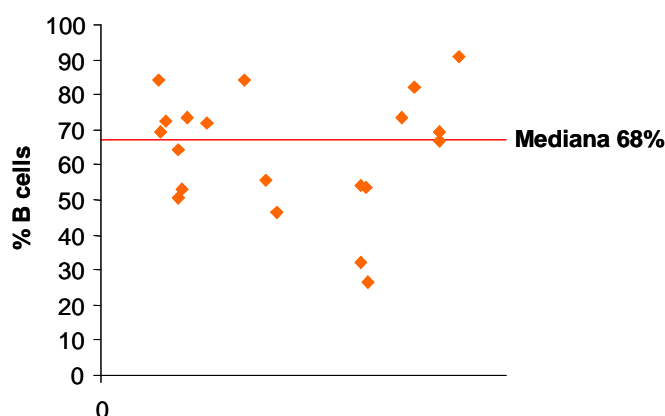


Figura 8: Linfociti B presenti in tonsille di pazienti pediatriche (valori calcolati in riferimento alle cellule mononucleate totali).

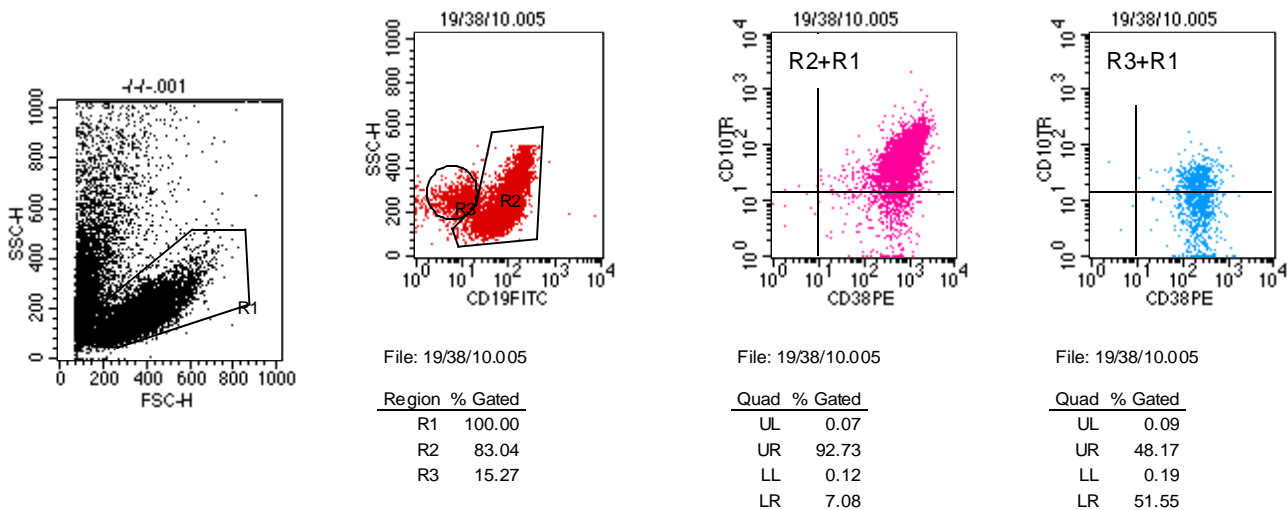
Le sottopopolazioni utilizzate per gli esperimenti sono risultate però molto meno rappresentate. I valori della mediana delle 3 sottopopolazioni rispetto ai linfociti B totali sono i seguenti:

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

2. Valutazione della purezza delle sottopopolazioni estratte (caratterizzazione immunofenotipica)

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

CD19 è un marcatore caratteristico dei 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 9**).



GC (% di cellule positive)	CD19	CD10	CD38	HLA-DR	CD23	CD3
	89,88±7,58	80,58±6,28	87,80±24,81	98,41±0,75	4,09±2,26	1,06±0,55

Figura 9 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule del centro germinativo (GC)

Le cellule in R2 nella figura 9 risultano negative per CD19 ma positive per CD10 e CD38 e sono quindi presumibilmente plasmacellule.

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 10**).

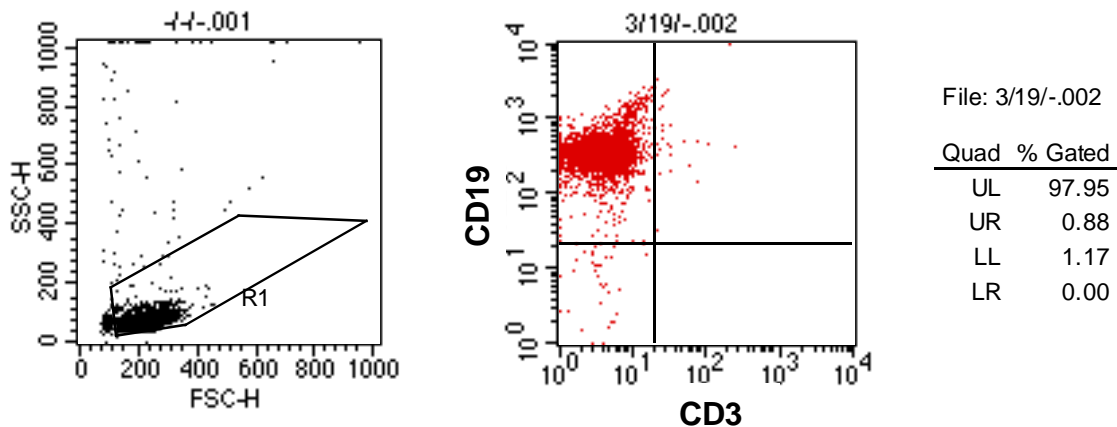
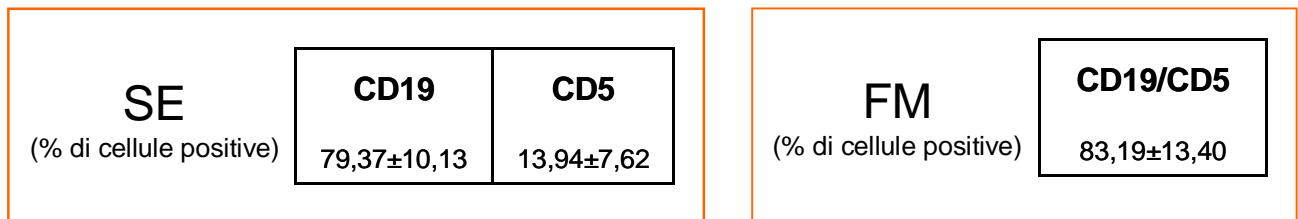


Figura 10 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule dello strato sottoepiteliale e del mantello follicolare

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.

I livelli di espressione di B7h sono stati valutati tramite analisi citofluorimetrica dopo aver marcato le cellule con anti-B7h-PE (e-Bioscience, diluizione 1:10): e' stato cosi' possibile stabilire la percentuale di cellule positive a tale marcatore, la quantita' di tale marcatore espressa su ogni singola cellula (MFI, intensita' mediana di fluorescenza) e la variazione di tali parametri in seguito a diverse stimolazioni.

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 le *resting*.

L'espressione di B7h risulta fortemente aumentata da SAC e PMA, sia da soli che associati ad IL-2, e da J558-CD40 transfected cells, sia da sole che in associazione a IL4, in tutte le sottopopolazioni studiate (figure 11-).

3.1 Linfociti B totali

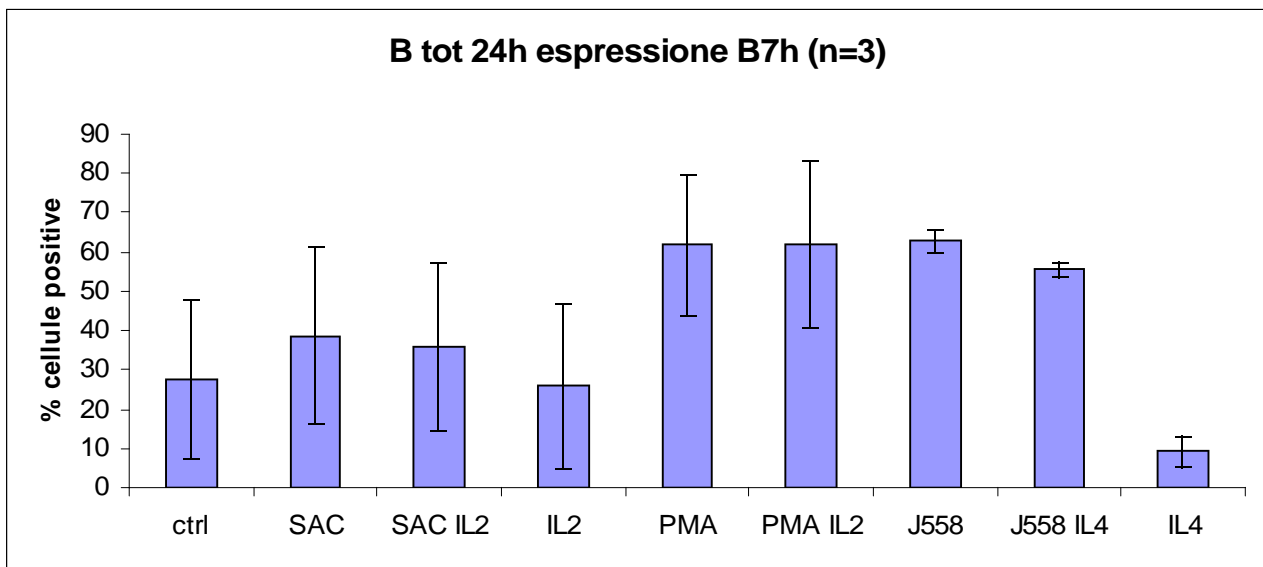


Figura 11 Percentuale di linfociti B tonsillari esprimenti B7h dopo 24h di trattamento

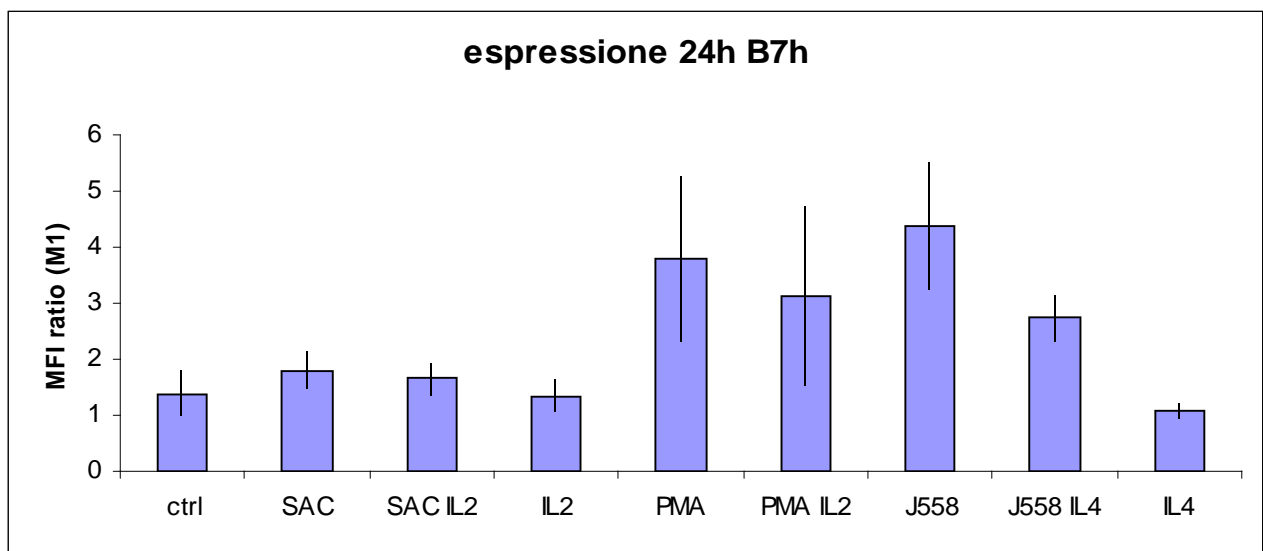


Figura 12 Intensita' mediana di fluorescenza dei linfociti B tonsillari esprimenti B7h dopo 24h di trattamento

3.2 Linfociti B del centro germinativo (GC) (n=9)

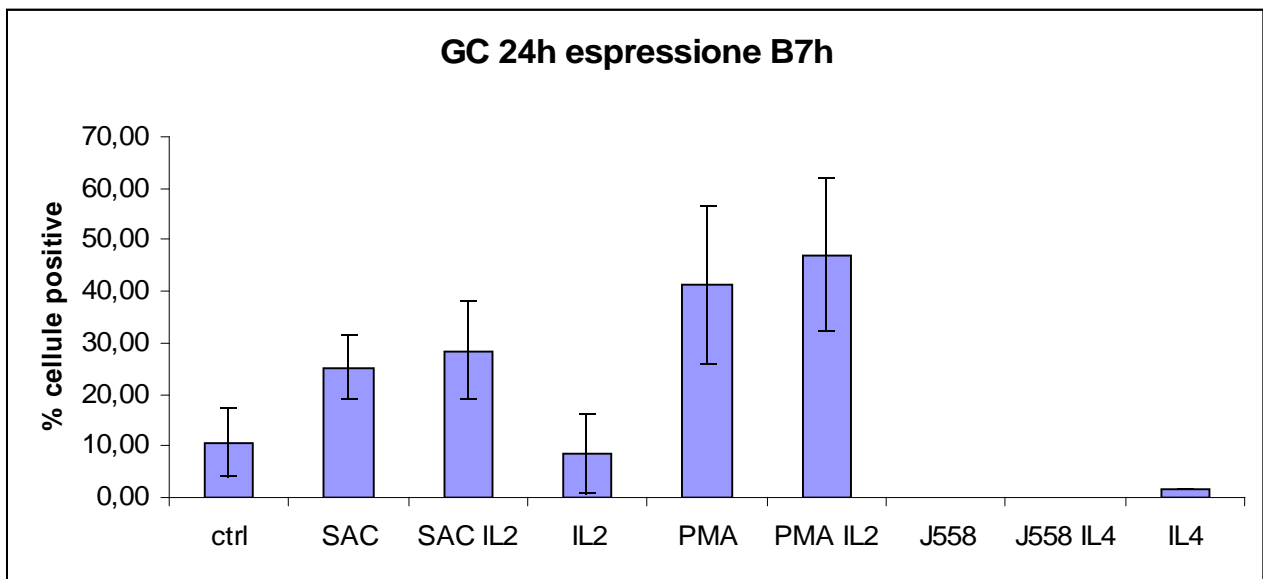


Figura 13 Percentuale di cellule del centro germinativo esprimenti B7h dopo 24h di trattamento

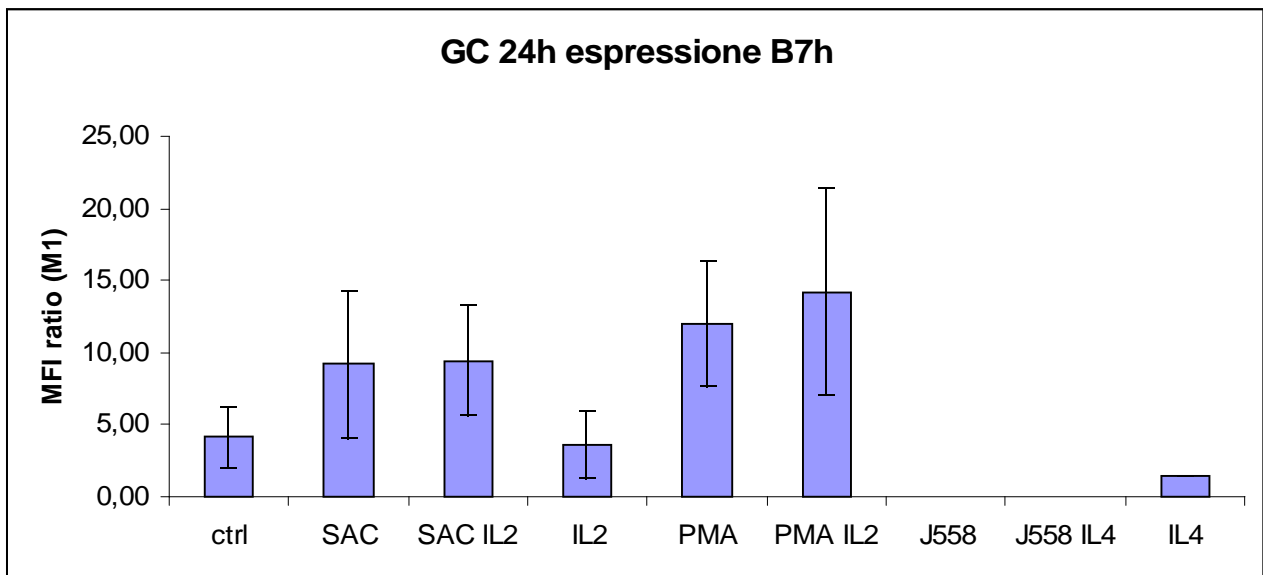


Figura 14 Intensita' mediana di fluorescenza delle cellule del centro germinativo esprimenti B7h dopo 24h di trattamento (nota: l'espressione in seguito a stimolazione con J558-CD40 non e' stata valutata)

3.3 Linfociti B "resting"

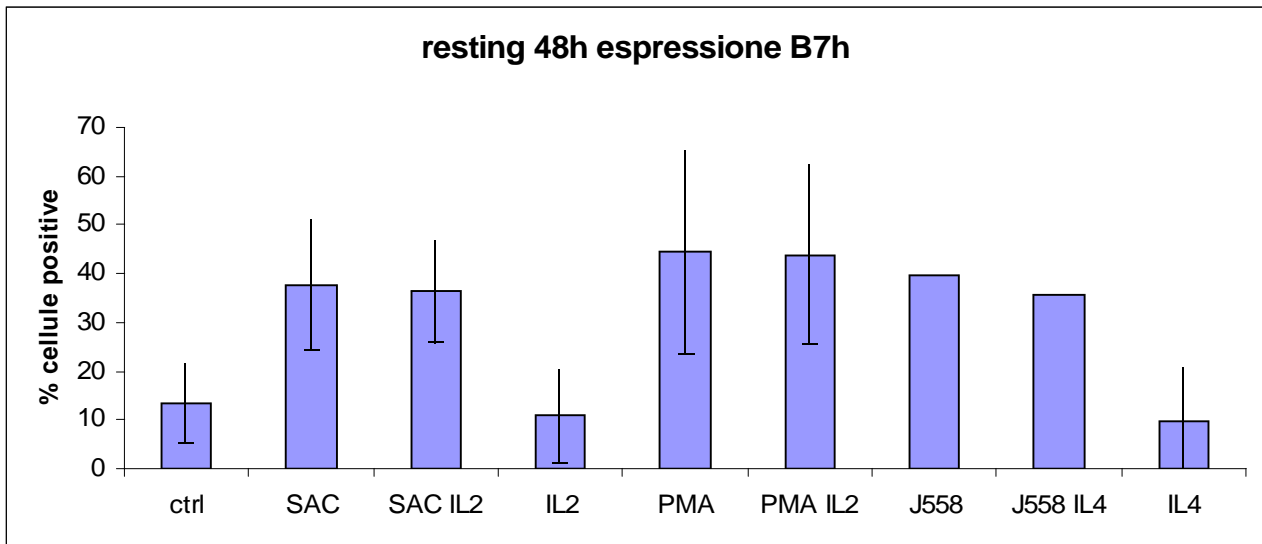


Figura 15 Percentuale di cellule resting esprimenti B7h dopo 48h di trattamento

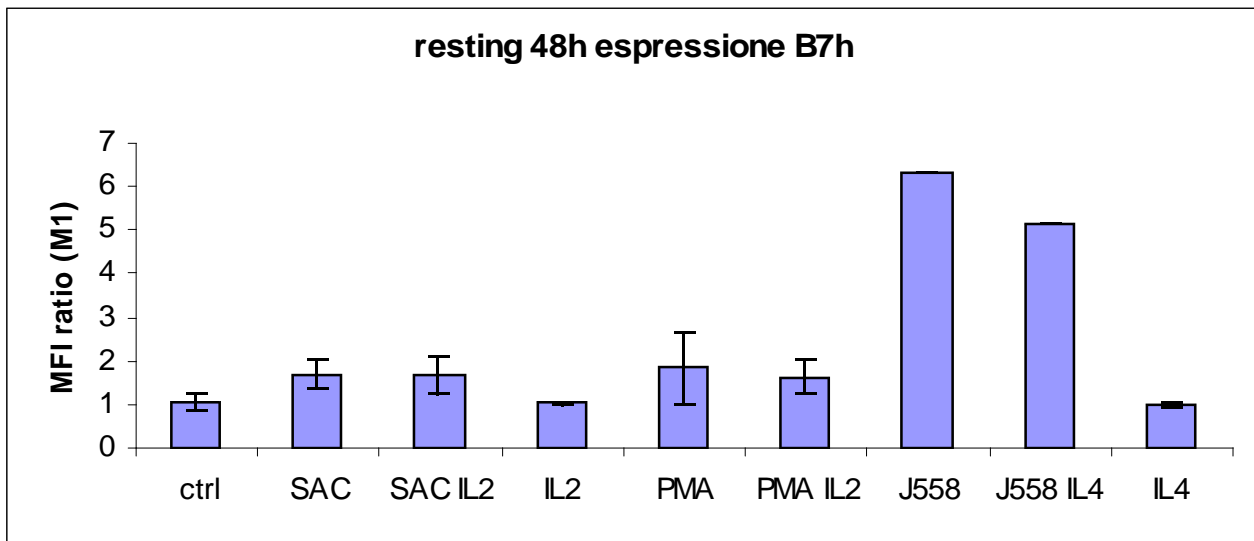


Figura 16 Intensita' mediana di fluorescenza delle cellule resting esprimenti B7h dopo 48h di trattamento

4. Effetti sulla proliferazione cellulare

Dopo aver valutato i livelli di espressione di B7h in seguito a diverse stimolazioni ho voluto valutare l'effetto della stimolazione di tale recettore in termini di proliferazione cellulare.

Nei precedenti anni ho già condotto simili esperimenti su altre APC, quali cellule dendritiche (DC) e macrofagi (MDM, monocyte-derived macrophages), volti allo studio del *reverse signaling* ovvero degli effetti della stimolazione di B7h da parte di ICOS sulla funzionalità di tali cellule. Lo stimolo utilizzato è la proteina chimerica ICOS-Fc (R&D), costituita dalla fusione della porzione extracellulare di ICOS con il frammento Fc delle IgG1.

Il problema principale di questo tipo di stimolo è la presenza, sulle APC, di recettori in grado di legare i frammenti Fc delle Ig e di attivare una serie di risposte in tali cellule. Per questo motivo come controllo degli esperimenti sono state utilizzate IgG1 solubili (R&D), in modo tale da escludere effetti aspecifici.

Nei linfociti B la situazione si è dimostrata più complicata, probabilmente a causa dell'elevata concentrazione di tali recettori sulla superficie cellulare e per l'impossibilità di saturare tali recettori senza inficiare la risposta di tali cellule agli stimoli di interesse.

Il secondo problema incontrato è che ha impedito di proseguire gli esperimenti sul promettente stimolo SAC e' sempre dovuto alla capacità di tale stimolo di legare frammenti Fc sia murini che umani tramite la proteina A di cui e' ricchissima la sua superficie.

SAC e' in grado di aumentare significativamente l'espressione di B7h e la ricerca di un modello sperimentale in grado di studiare il costimolo ICOS-SAC e' di particolare interesse.

4.1 hICOS-hFc in soluzione (T21, T27)

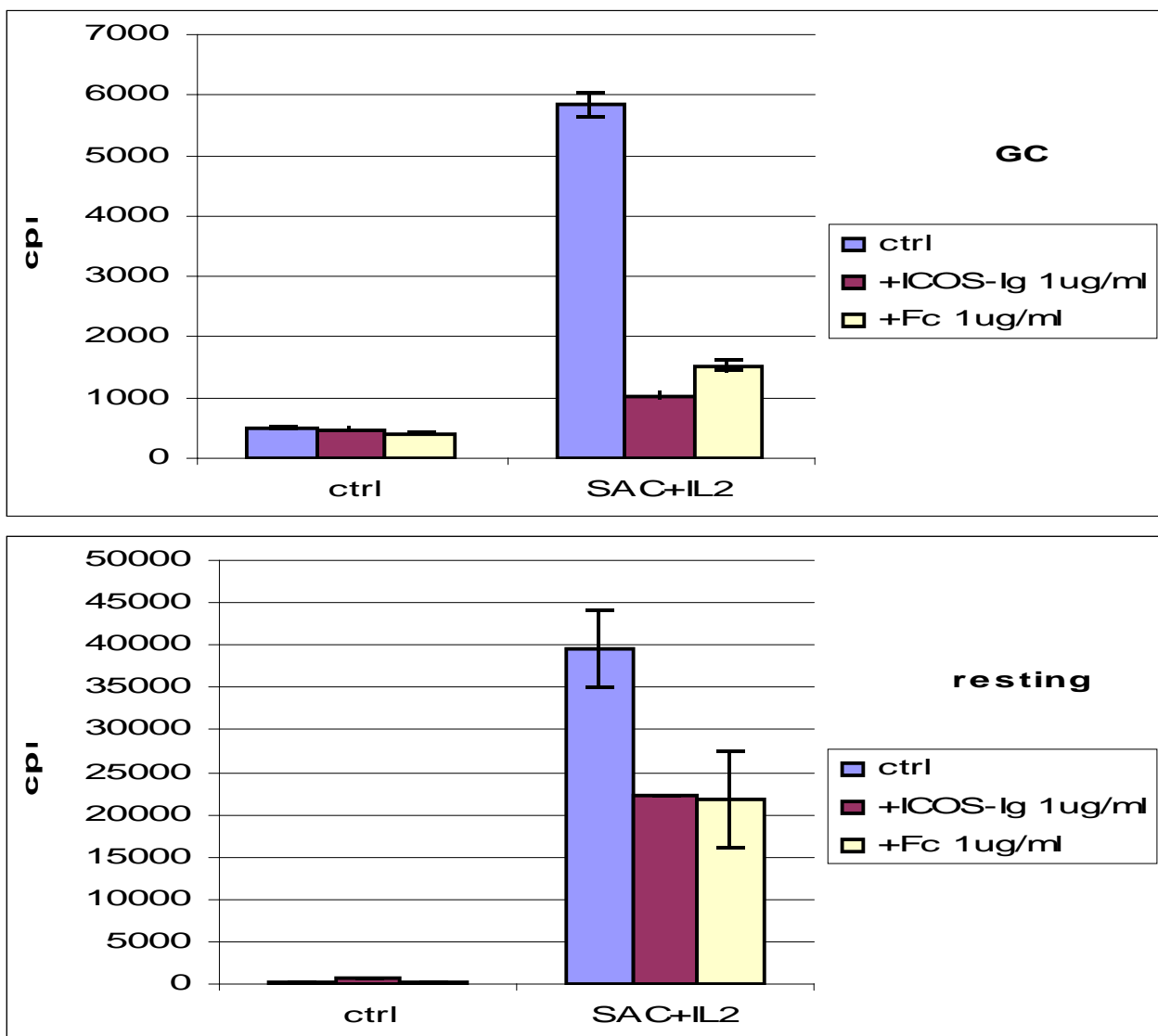


Figura 17

Nei primi esperimenti avevo focalizzato la mia attenzione su SAC, poiché è in grado di indurre una elevata espressione di B7h.

Pero' i risultati ottenuti non sono attendibili e non rispecchiano un reale effetto della stimolazione di B7h: la ridotta proliferazione in presenza di ICOS-Fc infatti

presumibilmente è dovuta al sequestro dello stimolo SAC da parte di ICOS-Fc. Un effetto di pari intensità si ha con il controllo negativo IgG (Fc) (**figura 17**).

Utilizzando ICOS-Fc ed Fc in concentrazioni equimolari (rapporto peso: peso 1:3; ICOS-Fc 0,5µg/ml: Fc 0,16µg/ml) (**figura 18**), la diminuita proliferazione sembra essere un effetto specifico di ICOS e non un'interferenza della coda Fc. Rimane il problema della possibile saturazione dello stimolo da parte di ICOS-Fc.

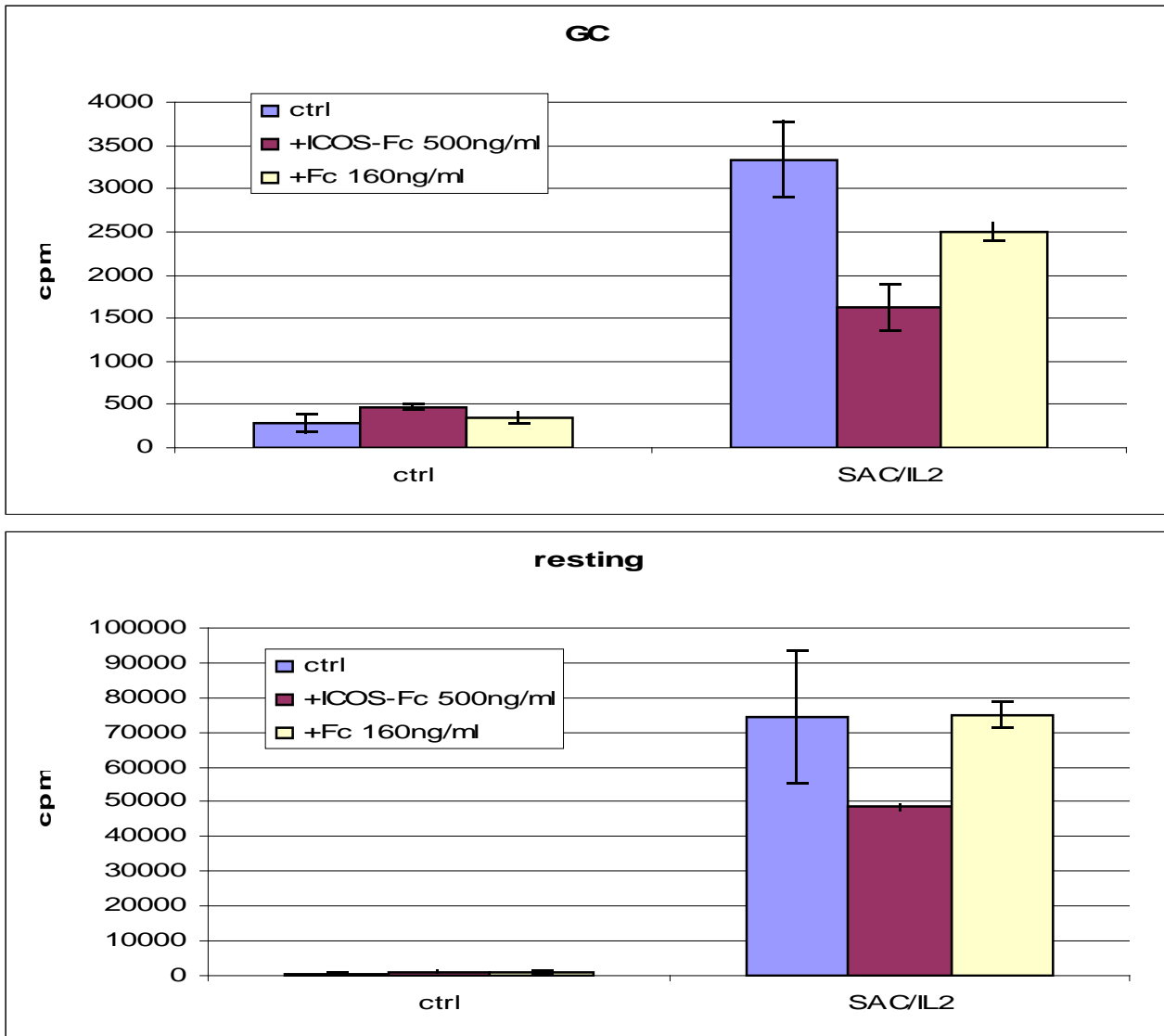
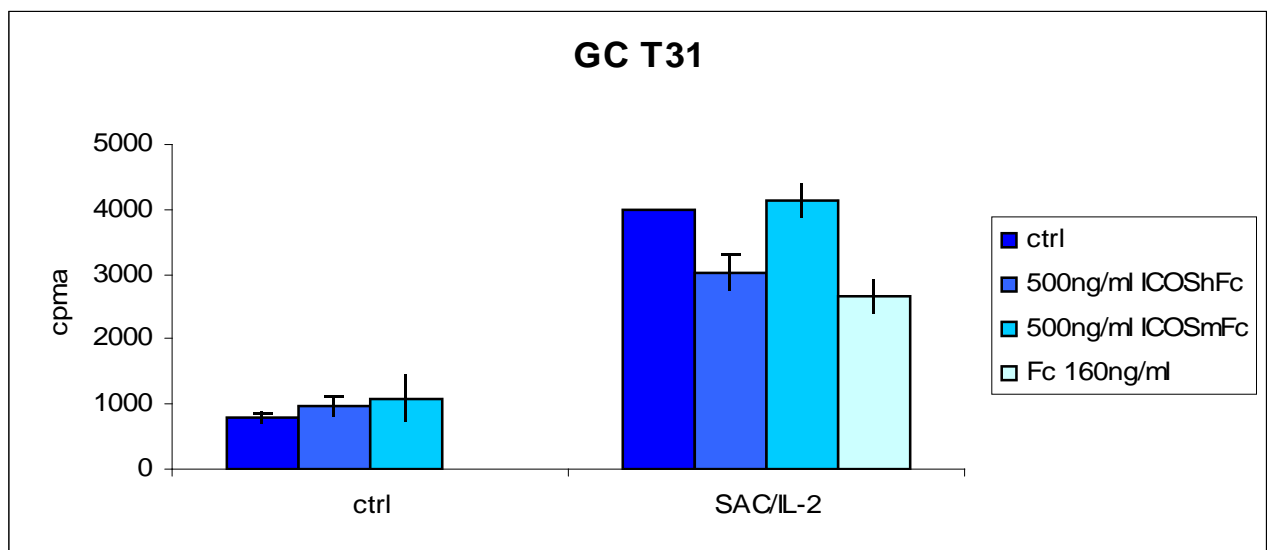
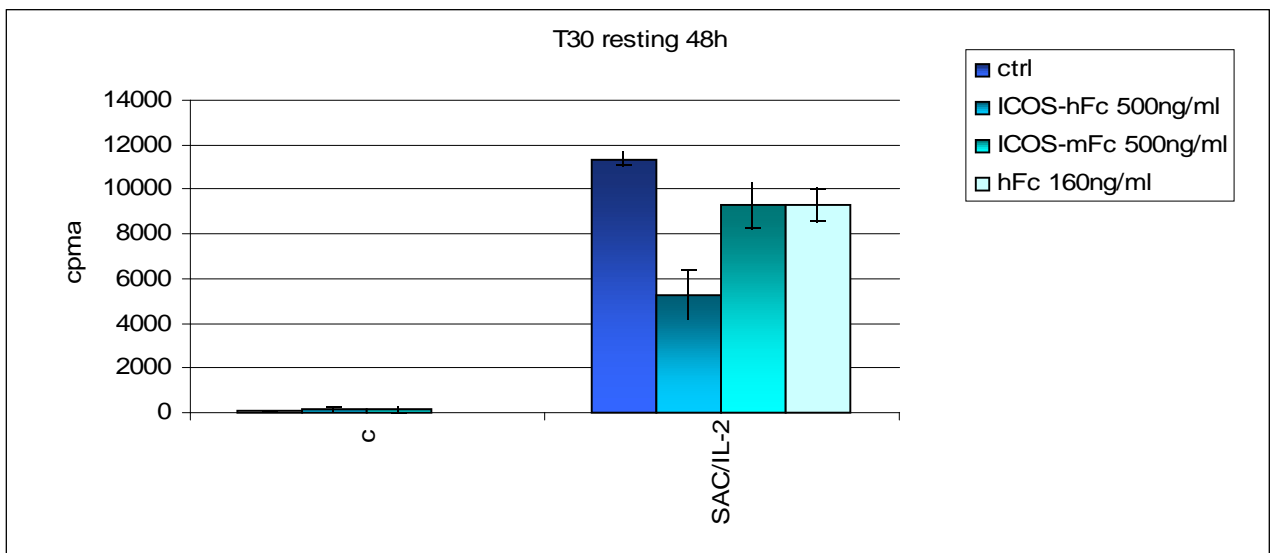
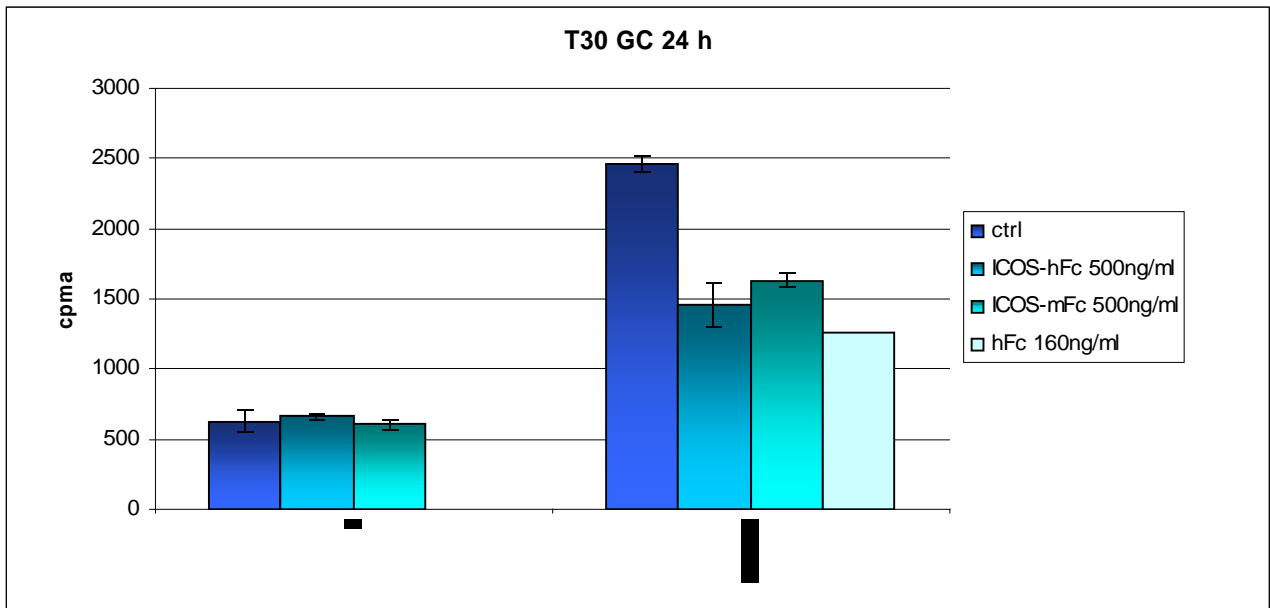


Figura 18

4.2 hICOS-hFc in soluzione (T30, T31, T32)

Per minimizzare ulteriormente le possibili risposte aspecifiche ho utilizzato la chimera hICOS-mFc (Ansell) (**figura 19**).



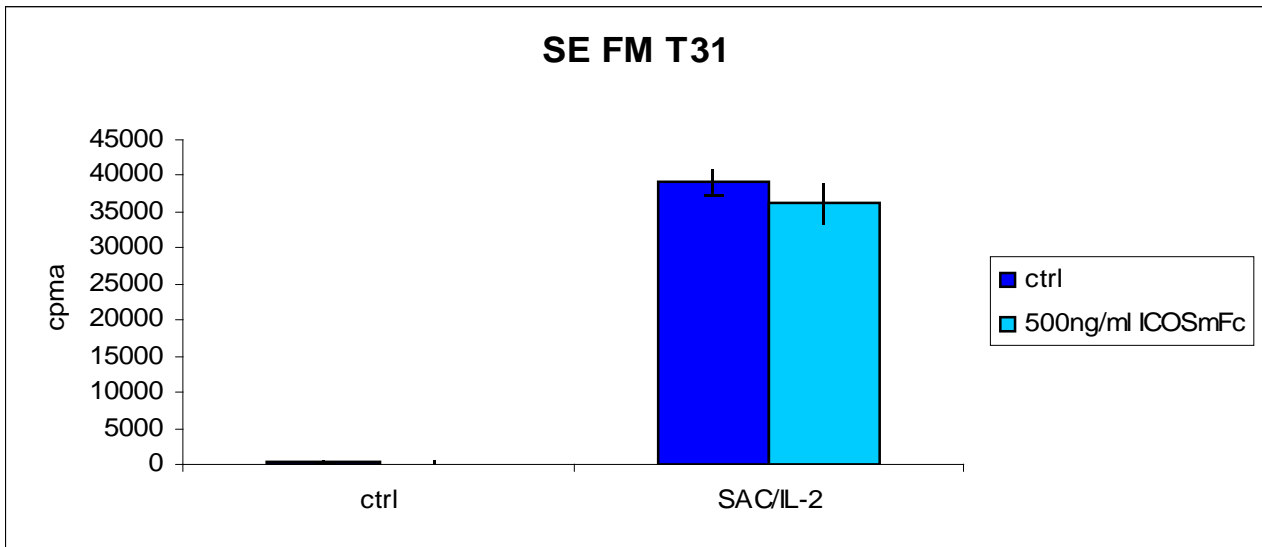


Figura 19

Purtroppo SAC e' in grado di legare sia IgG1 umane che IgG2 di topo. Inoltre non e' stato possibile ottenere risultati ripetibili e hICOS-mFc pare non essere in grado di influenzare la proliferazione dei linfociti B, diversamente da quanto sembra accadere con hICOS-hFc. Questo puo' essere dovuto al fatto che Fc murino sequestra con meno efficacia SAC.

4.3 hICOS-hFc coating (T33)

Il rivestimento della piastra con hICOS-mFc ha due scopi:

- 1) mascherare il piu' possibile la coda Fc (anche se non è certo che la proteina di fusione si leghi alla piastra sempre dalla parte di Fc)
- 2) permettere il cross-link di B7h, che mima meglio la condizione fisiologica di stimolazione e risulta nella maggior parte dei casi piu' efficace

Per il rivestimento hICOS-mFc è stato usato ad una concentrazione più elevata di quella usata in soluzione (3µg/ml) (**figura 20**).

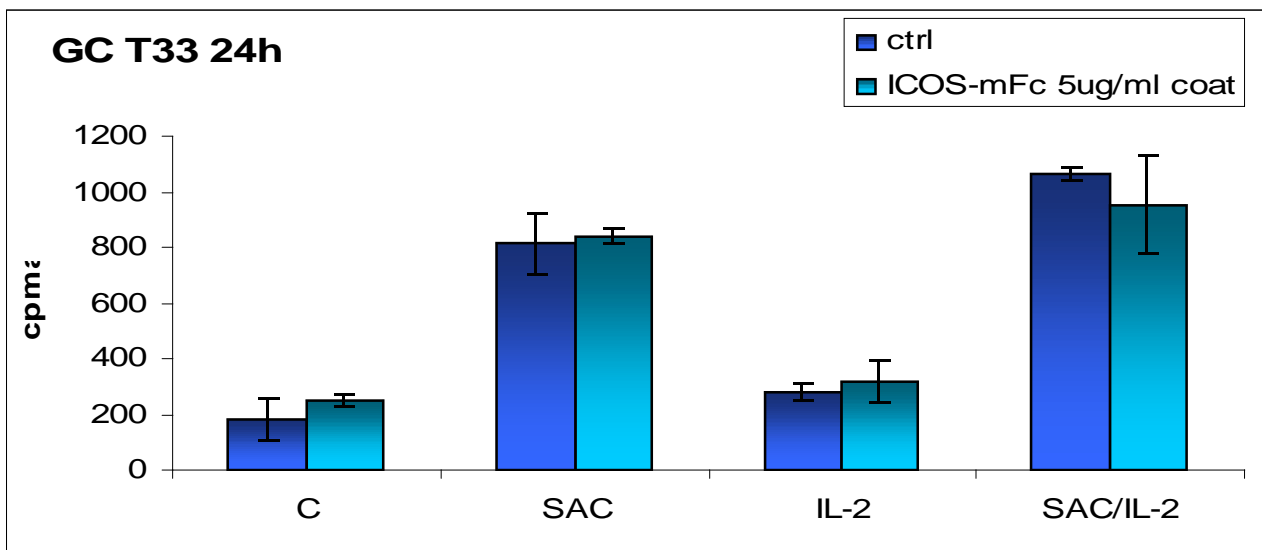


Figura 20

hICOS-mFc, essendo adeso alla piastra, non e' più in grado di sequestrare lo stimolo, che quindi induce una proliferazione paragonabile sia in presenza che in assenza di stimolazione di B7h.

Lo stesso tipo di esperimento è stato condotto con PMA (**figura 21**), uno stimolo con il quale hICOS-mFc non interferisce. Anche in questo caso però la diminuita proliferazione che si vede in presenza di ICOS-Fc sembra aspecifica e dovuta in gran parte alla probabile cross-reattività di Fc murino con i recettori per Fc umani.

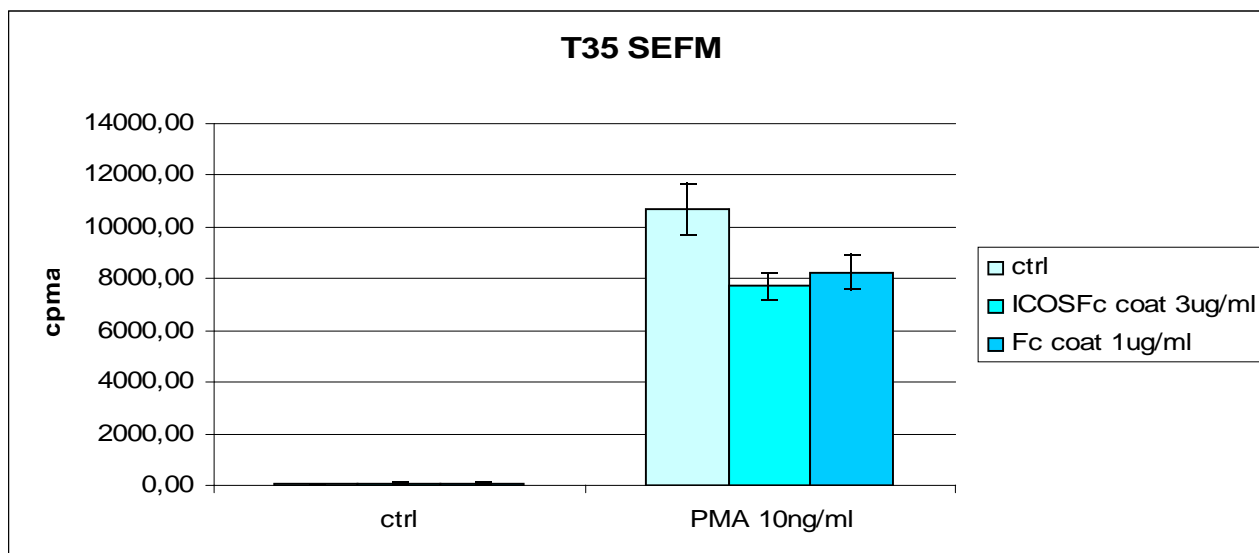
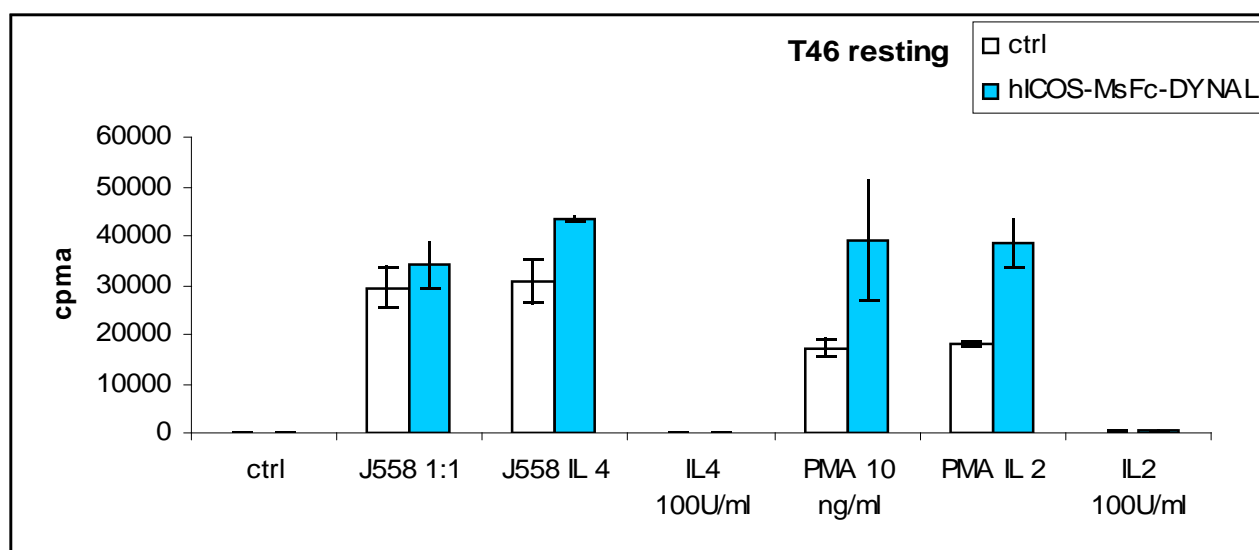


Figura 21

4.4 hICOS-mFc-coated Dynabeads (T46 e T44)

Le dynabeads permettono di ottenere una stimolazione molto piu' simile a quella fisiologica perche', una volta rivestite con l'anticorpo di interesse, simulano dimensioni e forma di una cellula che esprime il recettore che stiamo studiando ma non altre molecole interferenti. Il *coating* e' specifico perche' le dynabeads sono rivestite di anticorpi anti-mouse e quindi legano la proteina di fusione attraverso il suo frammento Fc.

Mentre in un primo esperimento sembrava chiaro un effetto stimolatorio della proliferazione sulle cellule in contatto coltura con ICOS-Dynal, in un secondo, effettuato con un controllo adeguato (Dynal rivestite con Fc di IgG2 di topo), tale effetto e' risultato aspecifico (**figura 22**).



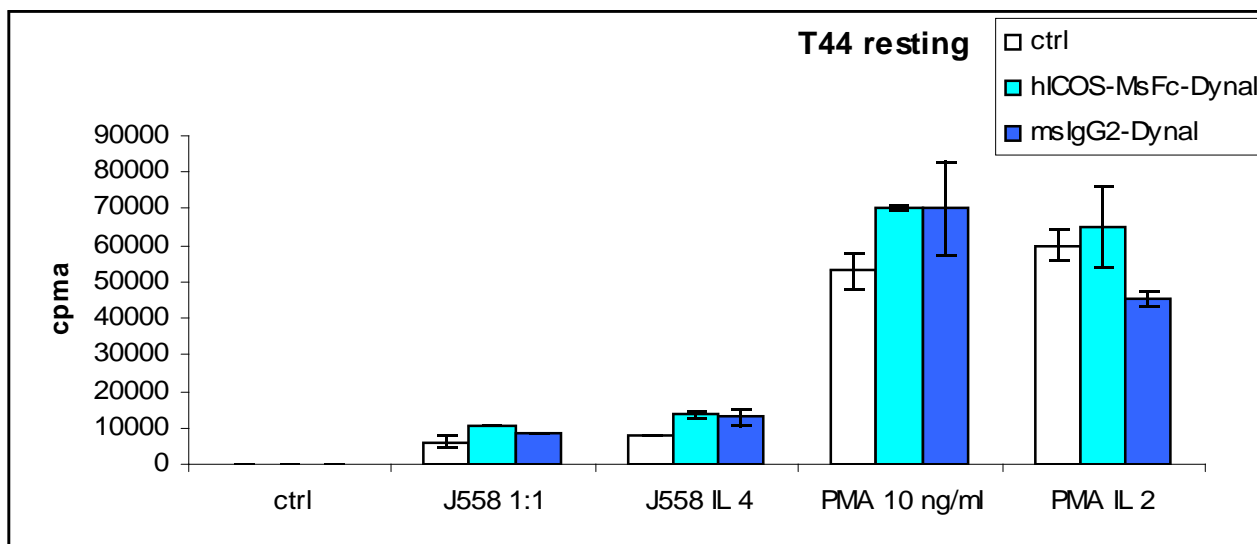


Figura 22

4.5 HUT78 e ICOS-Fab

In questo caso ho stimolato linfociti B totali estratti da tonsille (non ho isolato le sottopopolazioni perché ho preferito avere prima una visione più generale della risposta) con cellule HUT78, che sono una linea di linfociti T estratti dal sangue periferico di un paziente con sindrome di Sezary. Esibiscono le funzioni e le caratteristiche dei linfociti T maturi con fenotipo helper/effettore, rilasciano IL-2 ed esprimono costitutivamente ICOS in membrana.

Lo scopo dell'esperimento è stato valutare gli effetti specifici di ICOS confrontando la proliferazione di cellule stimulate con HUT78 tal quali e con HUT78 preincubate con un Fab di ICOS. Il Fab di ICOS "nasconde" ICOS e impedisce ad esso di stimolare B7h sui linfociti B.

In realtà il sistema rimane troppo complesso: non è possibile dire con certezza quali siano gli effetti realmente dovuti ad ICOS ed è difficile trovare una relazione con gli effetti visti utilizzando altri sistemi (figura 23).

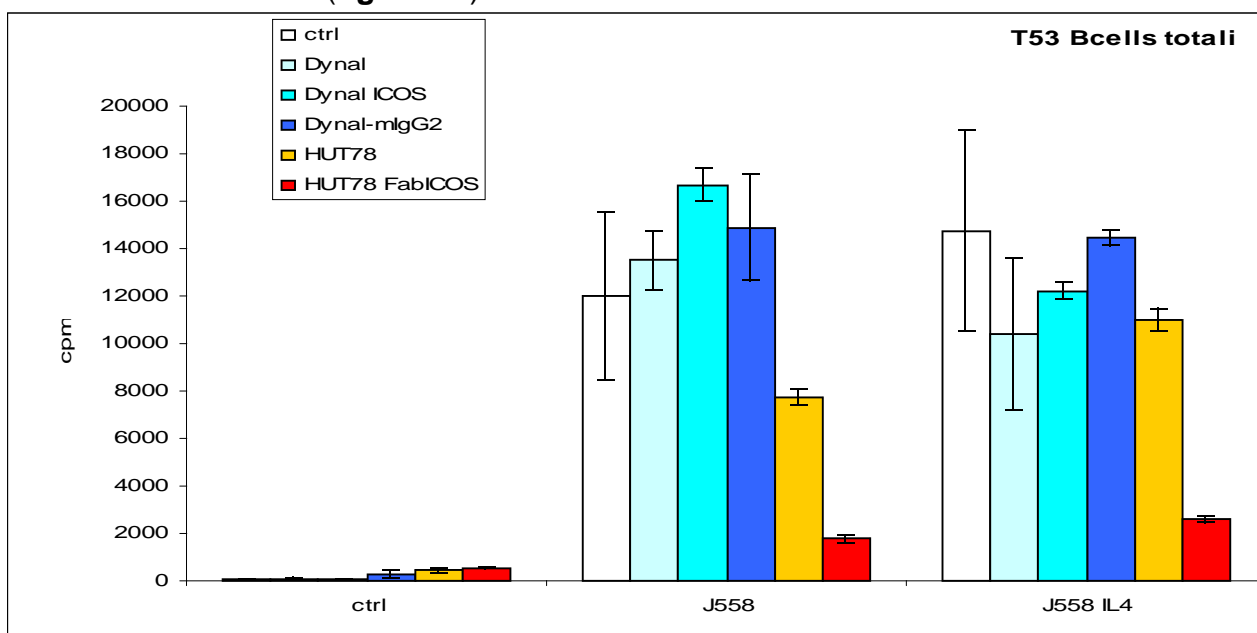


Figura 23

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

Per valutare gli effetti della stimolazione di B7h sul differenziamento di GC e *resting* è utile determinare in che misura la stimolazione di ICOS possa influenzare la produzione dei vari isotipi anticorpali (IgG, IgM, IgA, IgE) e lo *switch isotipico*. Infatti è questa la funzione che risulta particolarmente inficiata nei topi ICOS^{-/-}.

Per valutare la produzione di IgG è però necessario ottimizzare una metodica che permetta di evitare una sovrastima dovuta alla presenza di ICOS-Ig nei surnatanti raccolti. ICOS-Ig infatti, come già detto, è una proteina ricombinante contenente il frammento Fc delle IgG di classe I, che può essere riconosciuto dagli anticorpi utilizzati nella metodica ELISA e quindi falsare i risultati.

Ho utilizzato i surnatanti di vari esperimenti condotti nelle stesse condizioni di quelli effettuati per valutare gli effetti sulla proliferazione, con la unica differenza che tali surnatanti sono stati raccolti al 5° giorno di trattamento.

Le coppie di anticorpi utilizzate (Bethyl laboratories) non hanno permesso di rilevare la presenza di IgE e tuttora nessuna delle metodiche di stimolazione di B7h ha permesso di ottenere risultati ripetibili, specifici e significativi.

6. Prospettiva future

E' possibile:

- a) stimolare con concentrazioni di ICOS molto più elevate di quelle finora utilizzate per soppiantare l'effetto aspecifico di Fc.
- b) mutare la coda Fc della proteina di fusione per impedirne il legame con il recettore Fc (Stewer W et al., 1995).
- c) utilizzare trasfettanti stabili di ICOS in linee murine, come per esempio le J558, già usate per creare trasfettanti esprimenti CD40: il rischio è quello di avere un sistema troppo complesso.
- d) saturazione dei recettori Fc prima di stimolare con ICOS-Fc: questo sistema è rapido ma inficia i risultati dei test funzionali, soprattutto di differenziamento.

Bibliografia

- Aicher A., Hayde-Ledbetter M., Brady W.A., Pezzutto A., Richter G., Magaletti D., Buckwalter S., Ledbetter J.A. and Clark E.A., 2000. Characterization of human Inducible Costimulator Ligand expression and function. *The Journal of Immunology*, 164: 4689-4696
- Bich-Thuy LT., Revillard JP., 1982. Selective suppression of human B lymphocyte differentiation into IgG producing cells by soluble Fc γ receptors. *The Journal of Immunology*, 128 (1).
- 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)
- 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
- Delves HT, Braithwaite RA, Halls DJ, House I, Newton K, Peters TJ, Raja K, Sheehan T, Taylor A, White M, Widdop B, 2000. *Ann. Clin. Biochem.* 37 (6): 810-2.
- 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, Juedes AE, Temann UA, Shrestak S, Allisonk JP, Ruddle NH, Flavell RA, 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409 (4)
- Dong C., Temann U.A. and Flavell R.A., 2001. Critical role of Inducible Costimulator in germinal center reactions. *The Journal of Immunology* 166 (6): 3659-62.
- 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.

- 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.
- Dustin ML and Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science*. 1999.283:649-50.
- Evans DE, Munks MW, Purkerson JM, and Parker DC, 2000. Resting B Lymphocytes as APC for Naive T Lymphocytes: Dependence on CD40. *The Journal of Immunology* 164: 688-697.
- 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.
- Grohmann U, Puccetti P, 2002. The immunosuppressive activity of proinflammatory cytokines in experimental models: potential for therapeutic intervention in autoimmunity. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1 (1): 77-87. Review.
- 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.
- Holtrop S, Rijke-Schilder GP, Koene RA, Tax WJ, 1991. A polymorphic Fc receptor for mouse IgG2b on human B cells and monocytes. *Immunology*, 74(4): 613-20.
- 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.
- 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 Bcell 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 AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH, 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*, 409 (4)

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.

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.

Rankin CT., Veri MC., Gorlatov S., Tuailon N., Burke S., Huang L., Inzunza D., Li H., Thomas S., Johnson S., Stavenhagen, Koenig S., Bonvini E., 2006. CD32B, the human inhibitory Fc- γ receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood*, 108 (7).

Redoglia V, Dianzani 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.

Tafari A, Shahinian A, Blatt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VSF, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horank T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW, 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature*, 409 (4)

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.

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

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, 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 2006-2007:

Seminari seguiti:

GENE SILENCING BY RNA INTERFERENCE (RNAI)

10 GENNAIO 2007

Prof.ssa P. DeFilippi

DETECTION OF miRNA TARGET GENES THROUGH STATISTICAL ANALYSIS OF DNA MOTIFS IN HUMAN-MOUSE 3'-UTR REGIONS

17 GENNAIO 2007

Prof. M. Caselle

PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1: stiamo vincendo o stiamo perdendo?

18 GENAIO 2007

Prof. GF Bottazzo

GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA

1 FEBBRAIO 2007

Prof. B. Thöny

VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA

9 FEBBRAIO 2007

Prof. M Tripodi

FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE DYSMORPHOGENESIS

22 FEBBRAIO 2007

Prof. C. Bagni,

PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED SENSITIVITY

14 MARZO 2007

Dr. M. Cretich

COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI

15 MARZO 2007

Prof. M. Podda

MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI BIOMARCATORI TUMORALI

16 MARZO 207

Dott.ssa M. Capra

DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER

16 MARZO 2007

Dott: Bohmann

MARCATORI FARMACOGENETICI NEL CARCINOMA COLORETTALE: QUALI
PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA?

29 MARZO 2007

Prof. E. Mini

RELAZIONE TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE
ANALISI DEL PROTEIN DATA BASE

12 APRILE 2007

Prof. Milanese

DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR

16 MAGGIO 2007

Prof. Ferrari

THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING

25 MAGGIO 2007

Dott. Karlsson

TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR
SHWACHMANN DIAMOND SYNDROME

28 MAGGIO 2007

Dott. Ellis

SINDROMI AUTINFIAMMATORIE

4 GIUGNO 2007

Prof. A. Martini

BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRs AND FOR THE
PREDICTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE

21 GIUGNO 2007

Prof. E. Mignone

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI

I anno

Corso di Statistica – prof. Magnani

CONGRESSI FREQUENTATI

I anno

XXVII Congresso Nazionale SIP, Modena 20-23 febbraio 2005. *Le basi molecolari delle malattie*

II anno

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

III anno

V Congresso Nazionale SIICA–Trieste, 6-9 giugno 2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

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

“EFFETTI DELL’INTERAZIONE ICOS/B7h SULLE APC”

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

B) Altre comunicazioni

V Congresso Nazionale SIICA–Trieste, 6-9 giugno 2007

“EFFECTS OF REVERSE SIGNALING BY THE ICOS LIGAND B7h ON ACTIVATION/MATURATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS”

Mesturini R, Nicola S, Seren-Bernardone I, Dianzani U.

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO

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. *Eur. J. Immunol.* 36: 2601–2612.

ALTRO

- 1) SS Diagnostica delle malattie linfoproliferative, IST, Genova, sotto la supervisione della dott.ssa Simona Zupo: gennaio-aprile 2006. Estrazione di sottopopolazioni di linfociti B da tonsille.
- 2) Laboratorio di Immunologia, MBC, Università' di Torino, sotto la supervisione del prof. Guido Forni: giugno-luglio 2007. Modello murino di tumore mammario BALB-neuT.