

**Università degli Studi del
Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**

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

Relazione 3° anno:

**“Costimolazione dei linfociti T
tramite H4/ICOS”**

Responsabile scientifico:
Prof. Umberto Dianzani

Dottorando:
Riccardo Mesturini

Introduzione

1. I linfociti T

I linfociti T devono il loro nome al timo, l'organo in cui avviene la loro maturazione. Il linfocita T maturo esprime in membrana un recettore per l'antigene detto T Cell Receptor (TCR), associato ad un complesso di molecole transmembrana, detto CD3, che svolge la funzione di trasduttore 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. La porzione extracellulare di ciascuna catena contiene anche un dominio costante e una regione cerniera dove un residuo di cisteina permette la formazione di un ponte disolfuro tra le due catene. Una sequenza di residui amminoacidici idrofobici forma la porzione transmembrana di entrambe le catene. Una caratteristica singolare di tale regione è la presenza di residui carichi positivamente, una lisina nella catena β e una lisina ed un'arginina nella catena α . Tali residui interagiscono con amminoacidi carichi negativamente presenti nella porzione transmembrana dei polipeptidi del complesso CD3. Inoltre, le catene α e β possiedono code C-terminali intracellulari di lunghezza pari a 5-12 amminoacidi. Queste regioni sono troppo brevi perché possiedano un'attività enzimatica intrinseca, e sono quindi necessarie altre molecole associate al TCR per permettere la trasduzione del segnale. 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).

Nell'uomo esistono due categorie di molecole MHC:

- molecole di classe I, che comprendono HLA-A, HLA-B e HLA-C;
- molecole di classe II, che comprendono 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 (APC quali macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B) o di cellule bersaglio. Quando un linfocita T nativo incontra un antigene, presentato da una molecola MHC, si attiva ed inizia a proliferare, differenziandosi così in linfocita T effetore.

La trasduzione tramite il TCR dipende dall'associazione delle catene α e β del TCR con le catene γ , δ , ϵ di CD3. Le catene γ , δ ed ϵ hanno un dominio extracellulare immunoglobulinico e contengono un singolo motivo ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) 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.

Fa parte del complesso del TCR anche la catena ζ , presente come omodimero o come eterodimero se associato alla sua variante di splicing η . La catena ζ che ha una ridotta regione extracellulare e contiene tre motivi ITAMs nella coda citoplasmatica.

I linfociti T maturi esprimono anche proteine di superficie dette 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 sono glicoproteine di superficie dei linfociti T che si legano a regioni non polimorfe delle molecole MHC. CD4 è espresso come monomero, mentre la maggior parte delle molecole CD8 esiste sotto forma di eterodimeri, composti da una catena α e da una catena β legate da ponti disolfuro.

CD4 e CD8 svolgono due importanti funzioni:

- grazie alla loro affinità specifica per le molecole MHC, favoriscono l'adesione dei linfociti T ristretti per MHC alle APC o alle cellule bersaglio;
- 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 funzione di trasduzione del segnale è in parte da attribuirsi al fatto che la tirosina-chinasi Lck è associata alla coda citoplasmatica dei corecettori.

Esistono due sottopopolazioni di linfociti T, distinguibili in base all'espressione dei corecettori: T helper, che esprimono CD4, e T citotossici, che esprimono CD8. I peptidi derivanti da proteine citosoliche sono legati a molecole MHC di classe I e vengono

riconosciuti da linfociti T CD8⁺, solitamente ad attività citotossica (CTL); i CTL rappresentano il principale meccanismo di difesa dell'ospite nei confronti di microbi intracellulari che producono proteine nel citosol della cellula infettata (per lo più da virus). Per contro i peptidi derivati da proteine extracellulari che vengono endocitate da cellule specializzate sono poi associati a MHC di classe II e riconosciuti dai linfociti T CD4⁺, di solito ad attività helper.

In risposta al riconoscimento del complesso MHC-antigene, un linfocita T helper secerne citochine, importanti nell'attivare linfociti B, linfociti T, macrofagi ed altre cellule coinvolte nella risposta immune. Una cellula citolitica, dopo aver riconosciuto un complesso antigene-MHC, e sotto l'influenza delle citochine prodotte dai T helper, prolifera e si differenzia in una cellula effettrice, detta linfocita T citotossico, capace di uccidere le cellule bersaglio che presentano l'antigene per il quale sono specifiche.

I linfociti citotossici hanno una funzione fondamentale nel tenere sotto controllo le cellule dell'organismo, eliminando qualunque cellula esprima un antigene estraneo, come ad esempio cellule infettate da virus o cellule tumorali.

2. Attivazione dei linfociti T

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 [1-3]. Tale fenomeno è accompagnato da variazioni nell'espressione di alcuni geni che codificano per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione cellulare, nelle funzioni effettrici e nelle interazioni cellula-cellula. Secondo il modello d'attivazione classico, 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 complesso MHC-peptide (presente sulla superficie delle APC) al TCR ed ai corecettori CD4 e CD8; il secondo è fornito da molecole costimolatorie, molecole di superficie espresse sulle APC in grado di legarsi a recettori specifici presenti sui linfociti T [4].

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

Una delle più importanti molecole costimolatorie è CD28, espressa costitutivamente sulla superficie dei linfociti T. CD28 trasduce segnali che potenziano le risposte T all'antigene, interagendo con due differenti ligandi presenti sulla superficie delle APC: B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) [4]. CD28 sinergizza con lo stimolo trasdotto dal TCR nell'attivazione dei linfociti T "naive", ed induce la proliferazione. L'attività si attua mediante un aumento della

trascrizione dei geni e/o della stabilizzazione del relativo mRNA, mediante la secrezione di alti livelli di IL-2, e mediante la prevenzione dell'apoptosi o dell'induzione di anergia che si possono verificare in risposta al solo stimolo antigenico. Altre molecole accessorie svolgono invece un'azione opposta e sono coinvolte nello "spegnimento attivo" della risposta immunitaria. Un ruolo di questo tipo è stato proposto per molecole come CD95 e CTLA-4, e la perdita della funzione di ciascuna di queste due molecole induce patologie caratterizzate da linfoproliferazione e sviluppo di malattie autoimmuni. In particolare CTLA-4 è un omologo di CD28, lega B7-1 e B7-2, ed è espresso ad elevati livelli in seguito all'attivazione dei linfociti T [5].

L'efficacia e la durata della risposta immunitaria mediata dai linfociti T, dipende quindi non solo dalla presenza e dalla persistenza dell'antigene, ma anche da una serie di segnali inviati da molecole sia stimolatorie sia inibitorie.

Nonostante le numerose evidenze a sostegno dell'attività costimolatoria di CD28, non tutte le risposte immuni mediate dai linfociti T sono CD28-dipendenti; infatti nell'uomo solo l'80% delle cellule T risulta essere CD28 positive. Questo ha indotto a pensare che possano esistere vie costimolatorie aggiuntive coinvolte in alcune risposte immunitarie CD28-indipendenti. Tra i recettori che possono giocare un ruolo costimolatorio sono emersi LFA-I, SLAM, e recentemente H4/ICOS (*inducible costimulator*), un terzo membro della famiglia di CD28 [6].

Tali molecole sono espresse da diverse sottopopolazioni cellulari, e sembrano agire a differenti stadi dell'attivazione/differenziazione dei linfociti T, promuovendo lo sviluppo di diverse funzioni effettrici. Nessuna di queste vie costimolatorie alternative sembra sovrapporsi esattamente al segnale di CD28, in quanto, a differenza di quest'ultimo, sembrano incapaci di indurre l'attivazione di linfociti T "naive" e la produzione di elevati livelli di IL-2 [6].

Queste molecole agiscono abbassando il livello soglia richiesto per l'attivazione del TCR, rendendo più efficace la risposta immune, soprattutto in condizioni di basse concentrazioni di antigene od in presenza di antigene con scarsa capacità immunogena.

Recentemente è stato proposto un modello alternativo di costimolazione, che prevede la formazione di una "sinapsi immunologica", o "SMAC" (supramolecular activation cluster), a livello del punto di contatto tra APC e cellula T. Secondo questa teoria l'attivazione del linfocita comporta l'innescamento di un processo dinamico di reclutamento di complessi recettoriali verso lo SMAC [7].

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 GPI linked.

Le caratteristiche stesse dei raft lipidici, cioè la componente glicolipidica e la presenza di colesterolo, portano alla formazione di regioni di ridotta 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 [8].

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 porterebbe 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 [9]. 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.

3. *La molecola costimolatoria H4/ICOS*

H4 è una molecola espressa nella superficie dei linfociti T inizialmente identificata nel nostro laboratorio sia nel topo sia nell'uomo [11-12]. 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 [13]. Recentemente nel nostro laboratorio è stato dimostrato che H4 ed ICOS sono la stessa molecola [14].

H4/ICOS intensifica tutte le risposte basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di linfochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula. Cellule ICOS positive sono presenti negli organi linfoidei secondari, dove interagiscono con le cellule dendritiche, ed è espresso dai linfociti T del sangue periferico in seguito all'attivazione.

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

ICOS è una molecola transmembrana di tipo I, ed è espressa in forma monomerica o come 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 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 [15].

La parte citoplasmatica contiene un dominio che lega la fosfatidilinositolo3 chinasi (PI3K), questo indica che la costimolazione attraverso ICOS, così come quella attraverso CD28, potrebbe attivare nei linfociti segnali dipendenti da PI3K [16].

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 [13,17]. 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 e da linfociti B [18].

Scopo del lavoro

- Caratterizzazione funzionale della costimolazione mediata da ICOS sull'attivazione di linfociti T CD4 e CD8 naive.

Materiali e metodi

Anticorpi monoclonali ed immunofluorescenza

Per le analisi in immunofluorescenza sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mAb per antigeni umani anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD25, -CD20, -CD56 -CD14 -CD28,(Becton-Dickinson), -ICOS coniugati con PE o con FITC.

L' mAb C398.4A (H4), utilizzato in esperimenti su modello murino od umano, è stato prodotto nel nostro laboratorio e purificato per cromatografia di affinità su proteina G dal supernatante della coltura del corrispondente ibridoma.

Per determinare mediante immunofluorescenza l'espressione degli antigeni cellulari, le cellule sono state lavate in PBS + NaN₃ (0,1%) + 1% FBS (Fetal Bovine Serum) (PBS A/A) e trattate come segue.

Per rilevare l'espressione degli antigeni di superficie, 5×10^5 cellule sono state risospese in PBS A/A ed incubate 30 min. in ghiaccio con concentrazioni saturanti dell'appropriato mAb. I controlli negativi sono stati incubati con gli appropriati mAbs di controllo. 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, o anti-hamster FITC. Dopo 30 min. di incubazione in ghiaccio, le cellule sono state lavate in PBS A/A 3 volte ed immediatamente analizzate al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

Cellule

PBMC umani sono stati isolati da preparazioni concentrate di sangue periferico (buffy-coat) tramite centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD), + 10% FBS (v/v) (Fetal Bovine Serum) (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD) e 40 mg/ml di gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italia), penicillina, streptomina.

La purificazione dei linfociti T CD4⁺ è stata ottenuta mediante una prima rimozione per "panning" delle cellule CD11b⁺, HLA classe II⁺, CD45RO⁺ e dalla successiva rimozione delle cellule CD20⁺, CD8⁺ utilizzando beads magnetiche (MACS CD4⁺ Isolation kit II, Miltenyi). La purezza delle cellule CD4⁺ era circa del 96%, come stabilito mediante immunofluorescenza diretta e analisi citofluorimetrica.

Saggi di proliferazione

Negli esperimenti di proliferazione, i linfociti T CD4⁺ umani sono stati seminati a 5X10⁴ cellule/pozzetto in terreno Click RPMI+10% di siero fetale bovino in presenza di concentrazioni titolate degli appropriati stimoli.

Il mAb anti-CD3 (OKT3) e le proteine di fusione B7-1Ig e GI-50Ig sono stati usati in adesione, le cellule sono state incubate per 72 ore, e le ultime 6 ore con timidina triziata ³H-TdR (Amersham, Little Chalfont) (0.5µCi/pozzetto, 48 Ci/mmol), quindi sacrificate ed analizzate al contatore -β.

Valutazione delle citochine

Per l'analisi dei livelli sierici delle citochine analizzate è stato utilizzato il kit Human Th1/Th2 CBA (BD Biosciences) che consente la rilevazione simultanea di più molecole nello stesso campione tramite l'uso di un citofluorimetro (FACS Calibur, BD Biosciences) per concentrazioni dell'ordine del pg/mL; nel nostro caso sono state valutate IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α ed IFN-γ.

Il sistema fa uso di sei popolazioni di micro-biglie (necessarie per la cattura le citochine in sospensione), coattate ciascuna con un anticorpo monoclonale specifico per ciascuna delle sei citochine. Le sei popolazioni di biglie sono miscelate e risolte sul canale FL3 del citofluorimetro, poichè il monoclonale che le riveste ha differente intensità di FL3 secondo la popolazione.

La miscela di biglie è incubata con il campione (o con lo standard) e con una miscela di anticorpi monoclonali specifici per le sei citochine marcati con Ficoeritrina (rilevabile sul canale FL2) necessari alla quantificazione delle proteine; si formano dei complessi a "sandwich".

I risultati dell'acquisizione sono analizzati tramite il BD CBA Analysis Software sulla base della curva di calibrazione standard.

Risultati e discussione

Costimolazione di H4/ICOS sull'attivazione di linfociti T CD4⁺ naive

H4/ICOS media un segnale che induce proliferazione e produzione di citochine in linfociti T CD4⁺ totali. Studi nell'uomo, in base ad esperimenti condotti in vitro utilizzando anticorpi monoclonali, hanno evidenziato una prevalente induzione di TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-4, ed IL-5. Dati relativi ad una funzione di ICOS nell'attivazione di T naive umani non sono riportati in letteratura; studi nel topo, attraverso l'uso di topi knock-out per ICOS, hanno evidenziato un ruolo della molecola nelle fasi precoci dell'attivazione di linfociti naive con l'effetto di una regolazione dell'espressione di IL-4 (19,20). E' stata inoltre proposta una sinergia tra il costimolo mediato da ICOS ed IL-2 nella stimolazione di linfociti T CD4⁺, sia umani sia murini (20,21).

Ci siamo proposti di valutare se le osservazioni precedenti fossero valide su linfociti naive umani tramite l'uso dei ligandi naturali di CD28 (B7.1) ed ICOS (GL-50); un dato non scontato viste le differenze funzionali descritte nei test in vitro.

Inizialmente è stato riportato in letteratura che ICOS non è espresso da linfociti quiescenti, tuttavia, è stata da noi rilevata una debole espressione della molecola anche da parte di linfociti naive (come osservato da Riley et al.).

Per la prima parte del progetto il piano sperimentale ha previsto quindi di valutare l'effetto della costimolazione di H4/ICOS su linfociti T CD4⁺ naive (CD45RA⁺,CD45RO⁻), attivati via TCR oppure via TCR+CD28. La risposta cellulare è stata valutata come proliferazione cellulare, espressione di marcatori d'attivazione, e produzione citochinica. Il dosaggio citochinico è stato effettuato utilizzando un kit citofluorimetrico in grado di dosare contemporaneamente 6 citochine: IL4, IL5, (prodotte dai Th2), IFN- γ , TNF- α , IL2 (prodotte dai Th1) ed IL10 (prodotta da linfociti di tipo regolatorio).

I linfociti T CD4⁺ naive (purezza >96%) sono stati purificati partendo dai PBMC (peripheral blood mononuclear cells) di soggetti sani, e coltivati in presenza di vari stimoli. In particolare, gli stimoli erano costituiti da dosi ottimali di anti-CD3 (10 μ g/mL), in presenza o assenza di dosi fisse delle proteine di fusione GL50Ig (10 μ g/mL), B7-1Ig (3 μ g/mL), o GL50Ig + B7-1Ig. Per ogni condizione descritta è stata valutata la proliferazione cellulare e l'espressione di ICOS e CD25. Per ogni condizione sono stati inoltre raccolti i surnatanti di coltura dopo 65 ore di coltura, e sono state dosate le citochine prodotte (Figura 1).

I linfociti attivati tramite CD3 e CD28 producevano le citochine analizzate tranne IL-4 ed IL-5, l'ingaggio contemporaneo di CD3, CD28 ed ICOS ha mostrato che ICOS potenziava la secrezione di IL-10, IL-2, IFN- γ , e TNF- α (non mostrato in figura). In queste condizioni di coltura abbiamo inoltre osservato che la costimolazione mediata da ICOS induce forte proliferazione ed espressione di CD25 ed ICOS in membrana.

Ruolo di IL-2 ed IFN- γ nella costimolazione mediata da ICOS

La citochina IL-2 sembra avere un ruolo centrale nella costimolazione mediata da ICOS di linfociti T CD4⁺ totali (Riley et al.), è stato inoltre ipotizzato che ICOS induca la secrezione di quantità minime di IL-2 sufficienti tuttavia all'attività autocrina.

Data la forte produzione di IFN- γ ed IL-2 osservata nell'esperimento precedente è stato indagato l'effetto della neutralizzazione di queste citochine nella coltura cellulare. A tale scopo i linfociti sono stati attivati come descritto in precedenza ma in presenza o assenza di anticorpi anti-IL-2 o anti-IFN- γ bloccanti.

In particolare sono state utilizzate dosi sub-ottimali di anti-CD3 ed anti-CD28 per meglio studiare il contributo della costimolazione mediata da ICOS; in queste condizioni gli stimoli CD3 e CD3 + CD28 raramente hanno indotto attivazione cellulare.

Gli stimoli mediati da CD3, CD28 ed ICOS contemporaneamente inducevano forte proliferazione, espressione di H4/ICOS, secrezione di IL-2, IFN- γ , TNF- α ed IL-10 (IL-4 ed IL-5 non erano detectabili).

La neutralizzazione di IL-2 inibiva proliferazione, espressione di marker d'attivazione e secrezione citochinica; anti-IFN- γ aveva un effetto minore sull'attivazione cellulare (Figura 2).

Questi esperimenti hanno dimostrato che:

- la costimolazione mediata da ICOS necessita di CD28;
- che nella costimolazione mediata da ICOS l'effetto principale di CD28 è la produzione di IL-2;
- la coppia costimolatoria GL50/ICOS può avere un ruolo nell'attivazione di linfociti Th naive, e costituire il "terzo stimolo" nell'attivazione linfocitaria.

Costimolazione mediata da ICOS di Th naive in presenza di IL-2 esogena

Il ruolo di IL-2 nella costimolazione mediata da ICOS si è dimostrato centrale anche nel nostro piano sperimentale, il passo successivo è stato indagare se IL-2 fosse in grado di sostituire lo stimolo mediato da CD28 nella costimolazione mediata da ICOS.

I linfociti sono stati pertanto attivati con forti dosi di anti-CD3 e GL50-Ig, ma con IL-2 esogena al posto di B7.1-Ig.

Come mostrato in figura 3 gli stimoli mediati da CD3 ed ICOS non erano in grado di indurre attivazione, ma la presenza di IL-2 esogena (20 U/mL) induceva proliferazione e secrezione citochinica; questi effetti erano comparabili a quelli ottenuti da una coltura di linfociti attivati via CD3 + CD28. Per sottolineare l'efficacia del costimolo mediato da ICOS è utile ricordare che mentre CD28 è costitutivamente espresso, ICOS all'inizio della coltura sia espresso a bassissimi livelli da un linfocita naive; è anche interessante notare come IL-10 è maggiormente indotta da ICOS (compatibilmente ai dati riportati in letteratura su linfociti CD4 totali; Hutloff et al.).

Lo studio si conclude valutando l'effetto della neutralizzazione di IFN- γ , fortemente indotto da ICOS anche in queste condizioni, nel tipo di attivazione in esame. In figura 4 è mostrato come neutralizzando IFN- γ era inibita la produzione di IL-10 e parzialmente l'espressione di ICOS stesso. Contemporaneamente anti-IFN- γ non inibiva la proliferazione cellulare (non mostrato), un risultato prevedibile derivante dall'uso di IL-2 esogena.

Questi dati possono farci concludere che:

- potrebbe esistere un loop a feedback positivo tra ICOS ed IFN- γ nell'attivazione linfocitaria.

In conclusione possiamo dire che in linfociti Th naive la costimolazione mediata da ICOS induce la secrezione della citochina infiammatoria IFN- γ e della citochina anti-infiammatoria IL-10, e che la costimolazione richiede IL-2 e coinvolge un loop a feedback positivo con IFN- γ .

Costimolazione di H4/ICOS sull'attivazione di linfociti T CD8⁺ naive

Sono stati infine condotti studi simili ai precedenti, tuttora solo preliminari, su linfociti T CD8⁺ naive. Come mostrato in figura 5 e 6 si possono trarre conclusioni analoghe a quelle relative alla costimolazione mediata da ICOS di linfociti Th.

In riguardo sia alla proliferazione cellulare sia all'espressione della molecola, ICOS e CD28 sembrano agire in sinergia, ed anche per questa popolazione linfocitaria IL-2 sembra avere un ruolo decisivo nella costimolazione mediata da ICOS.

In futuro indagheremo secrezione citochinica, e ruolo di IL-2 ed IFN- γ dei linfociti citotossici.

Ancor più interessante potrebbe rivelarsi lo studio della sottopopolazione CD8⁺ CD28⁻, considerata da alcuni anni "soppressoria" delle funzioni linfocitarie, in cui il ruolo di ICOS, espresso in seguito ad attivazione, potrebbe essere decisivo data l'assenza di stimoli mediati da CD28.

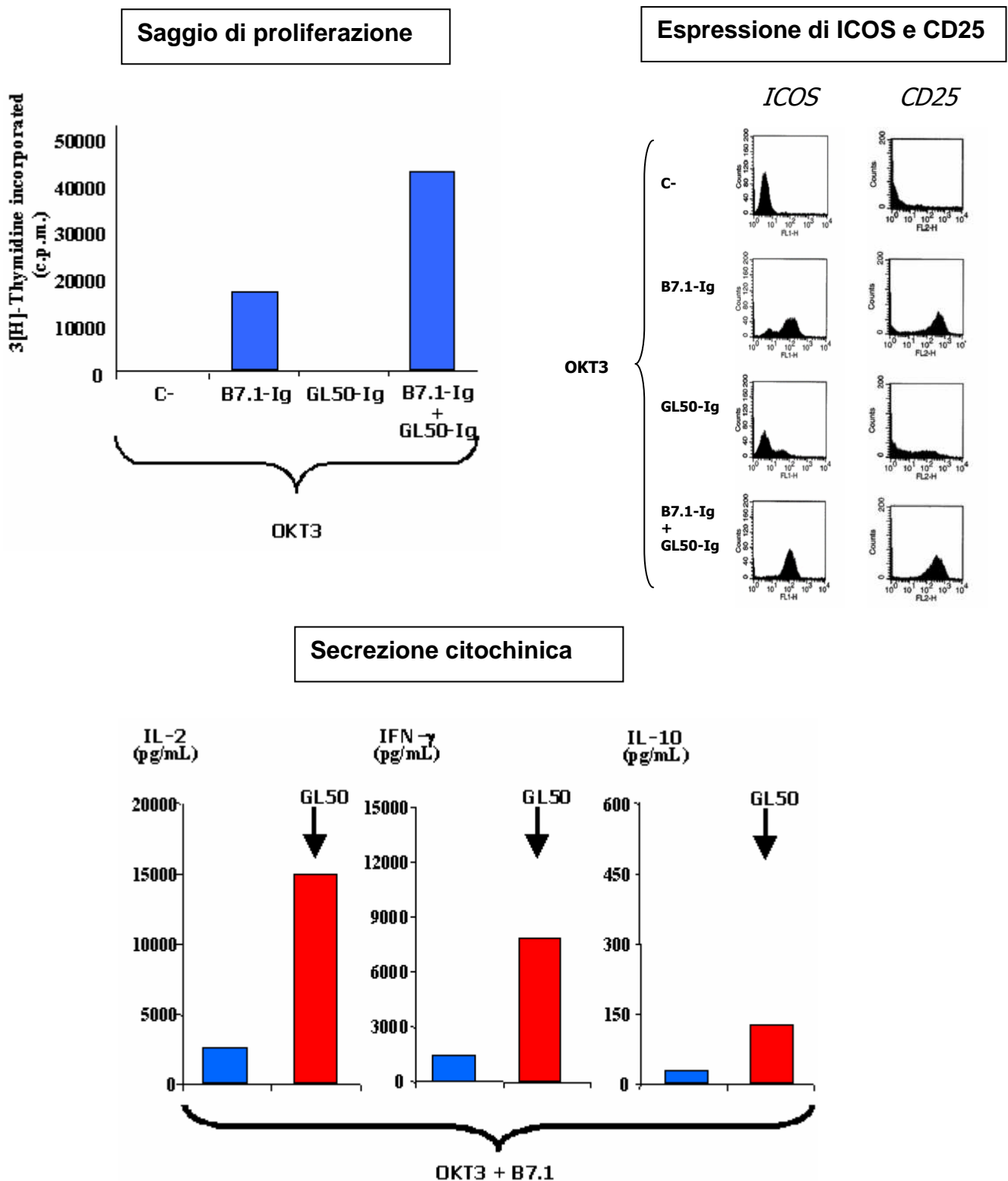


Figura 1. Costimolazione della proliferazione di linfociti T CD4 naive tramite B7-1Ig e GL50-Ig.

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/mL) in presenza o assenza di GL50Ig (10 μ g/mL), B7-1Ig (3 μ g/mL), o GL50Ig + B7-1Ig, utilizzati in adesione alla piastra. L'incorporazione di ³H-TdR durante le ultime 6 ore di tre giorni di coltura è espressa in c.p.m. (conte per minuto). L'espressione di ICOS e CD25 è stata valutata dopo 96 ore di coltura. I surnatanti di coltura sono stati raccolti dopo 65 ore, e le citochine sono state dosate.

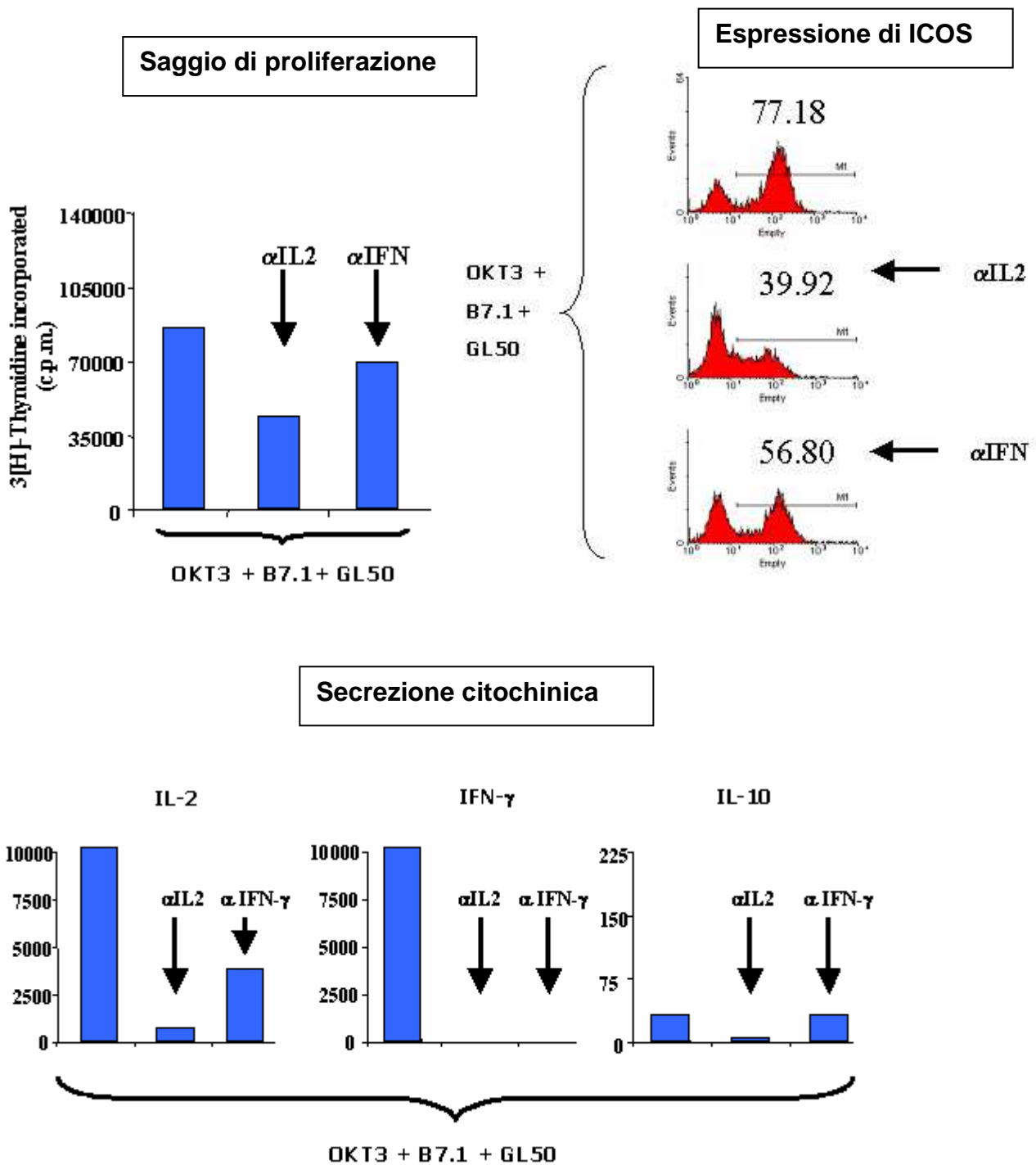


Figura 2. Costimolazione di linfociti T CD4 naive tramite B7-1Ig e GL50-Ig, in presenza o assenza di anticorpi bloccanti IL2 o IFN γ .

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (0,1 μ g/mL) in presenza o assenza di GL50Ig (10 μ g/mL), B7-1Ig (3 μ g/mL), o GL50Ig + B7-1Ig, in presenza o assenza di anti-IL2 o anti-IFN γ (20 μ g/mL). L'incorporazione di ³H-TdR è stata valutata come in precedenza, l'espressione di ICOS è stata valutata dopo 65 ore di coltura. I surnatanti di coltura sono stati raccolti dopo 65 ore, e le citochine sono state dosate.

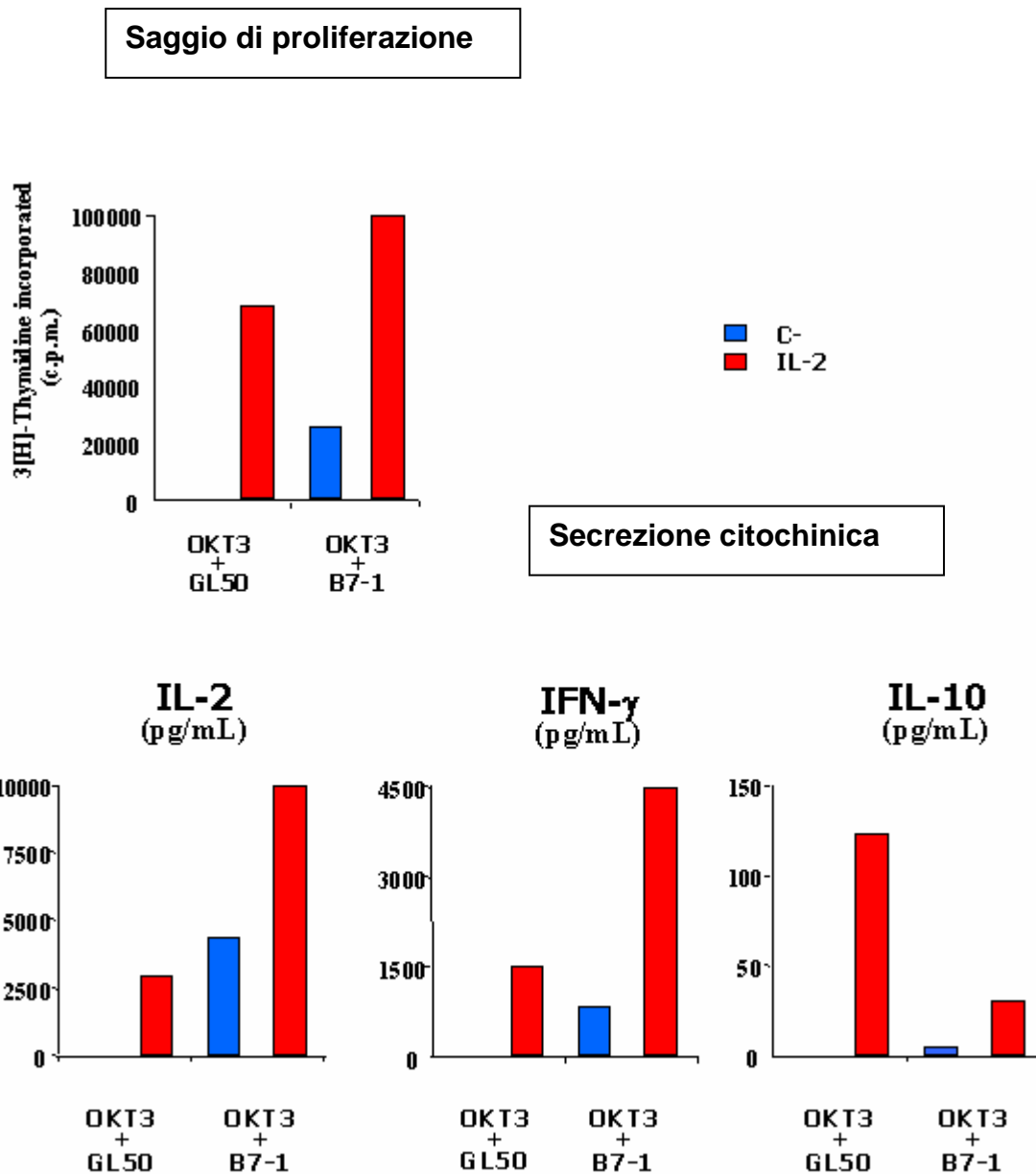
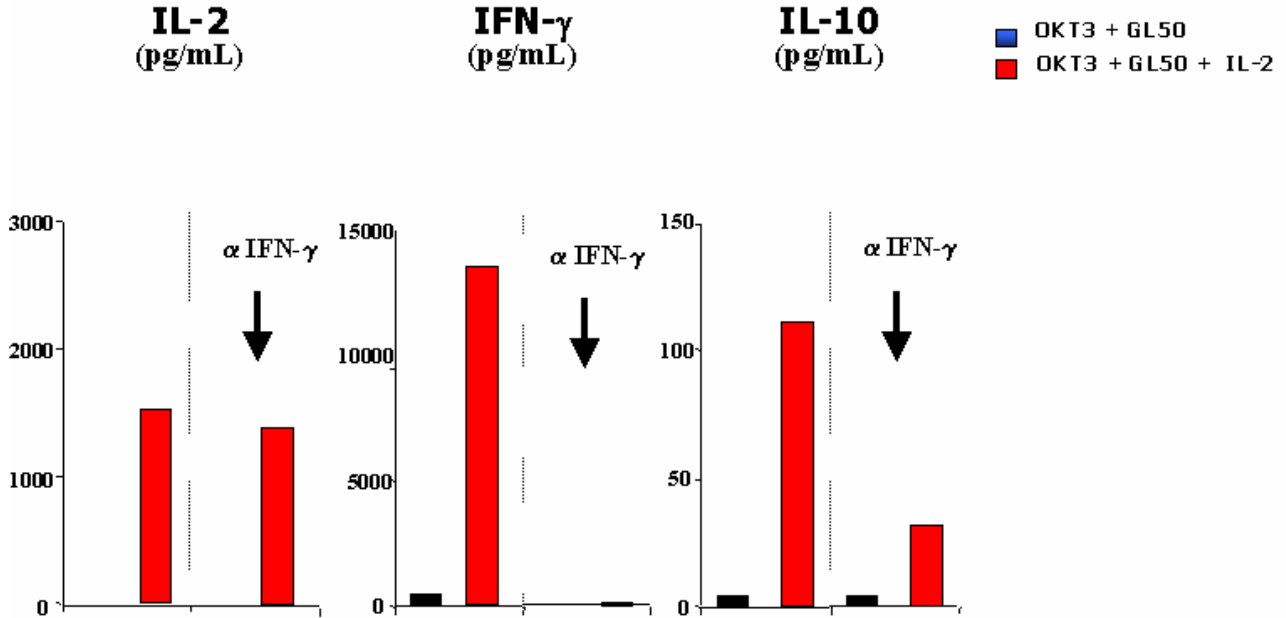


Figura 3. Costimolazione di linfociti T CD4 naive tramite B7-1Ig o GL50-Ig, in presenza o assenza di IL2.

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/mL) in presenza di GL50Ig (10 μ g/mL) o B7-1Ig (3 μ g/mL), in presenza o assenza di IL2 esogena (20 U/mL). I surnatanti di coltura sono stati raccolti dopo 65 ore, e le citochine sono state dosate.

Secrezione citochinica



Espressione di ICOS

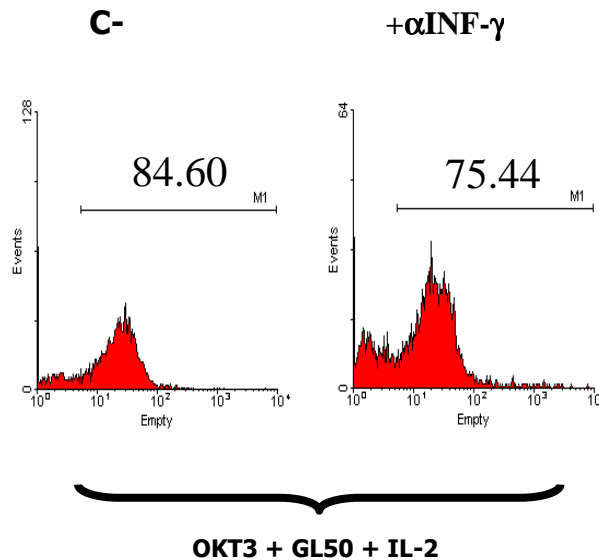


Figura 4. Costimolazione di linfociti T CD4 naive tramite GL50-Ig, presenza o assenza di IL2 o anticorpi bloccanti IFN γ .

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/mL) e GL50Ig (10 μ g/mL) in presenza o assenza di IL2 esogena (20 U/mL) ed anti-IFN γ (20 μ g/mL). L'espressione di ICOS è stata valutata dopo 65 ore di coltura, i surnatanti di coltura sono stati raccolti dopo 65 ore, e le citochine sono state dosate.

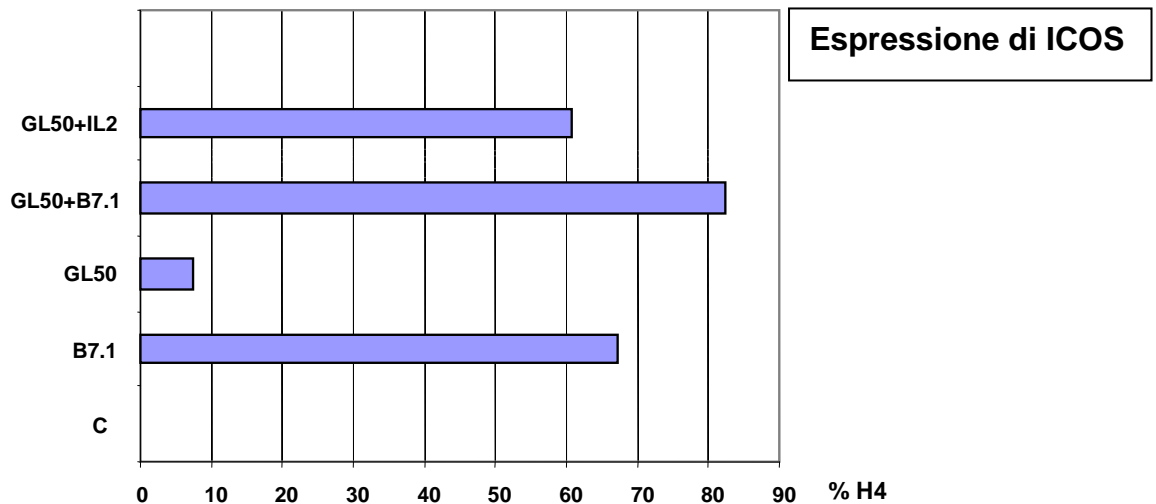
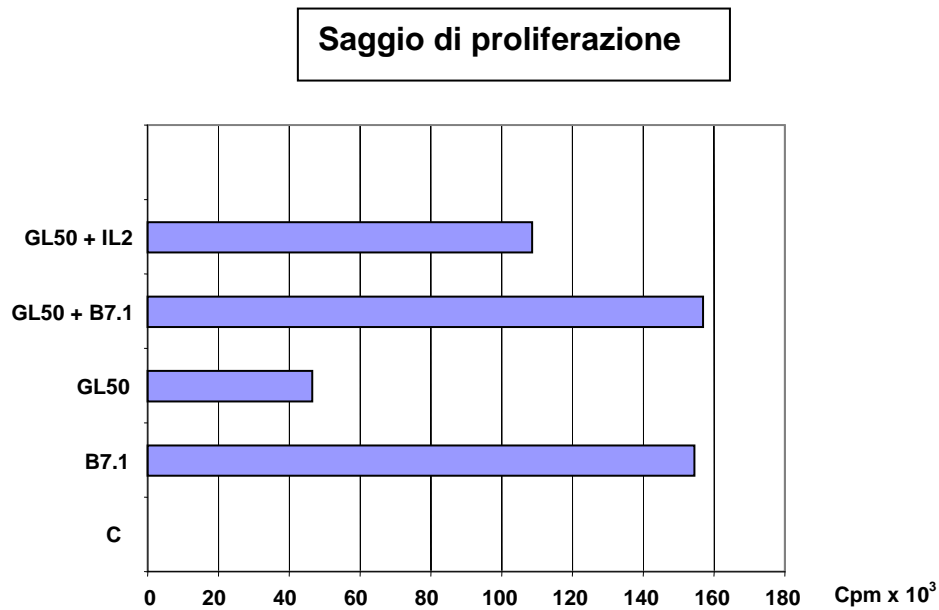


Figura 5. Costimolazione di linfociti T CD8 naive tramite B7-1Ig e GL50-Ig, in presenza o assenza di IL2.

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (10 µg/mL) in presenza o assenza di GL50Ig (10 µg/mL), B7-1Ig (3 µg/mL), o GL50Ig + B7-1Ig, in presenza o assenza di IL2 (20 U/mL). L'incorporazione di ³H-TdR è stata valutata come in precedenza, l'espressione di ICOS è stata valutata dopo 65 ore di coltura.

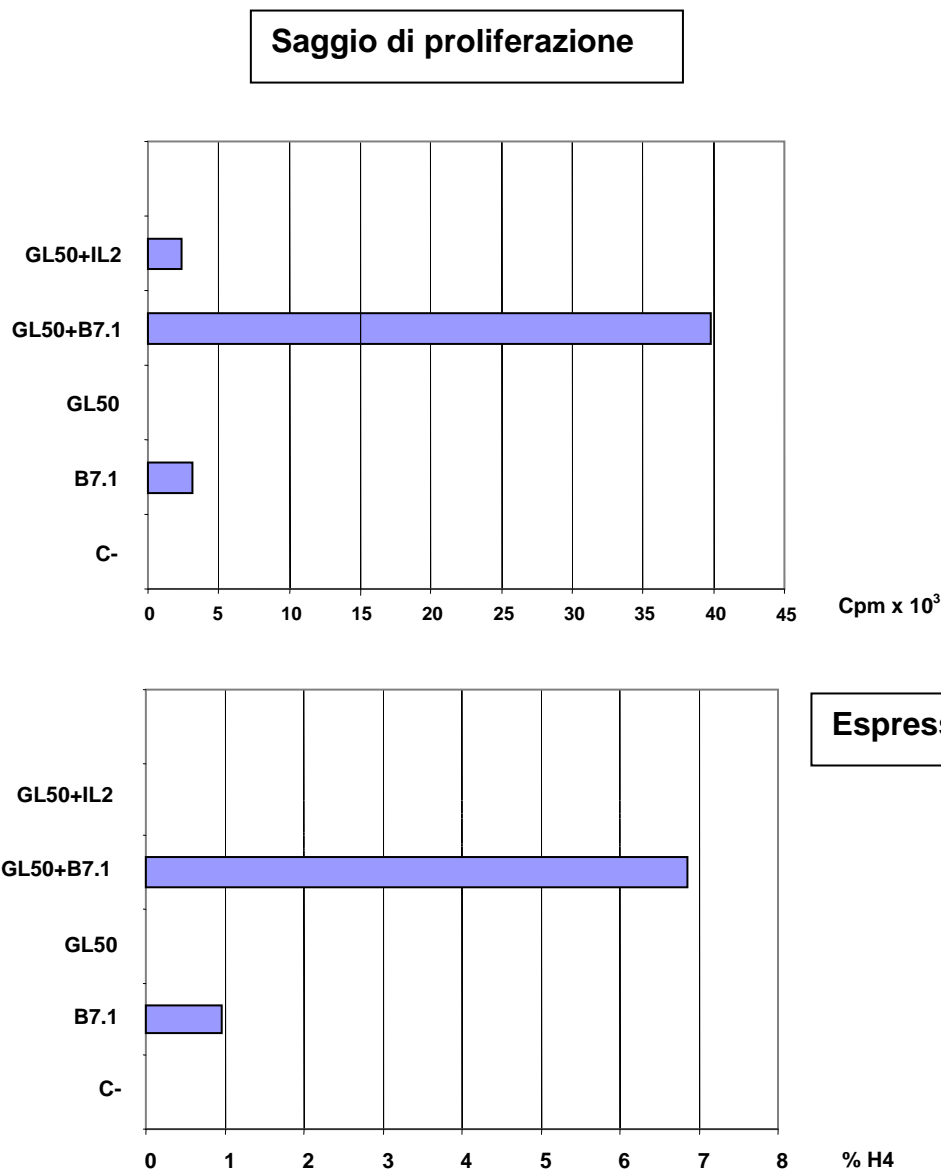


Figura 6. Costimolazione di linfociti T CD8 naive tramite B7-1Ig e GL50-Ig, in presenza o assenza di IL2.

I linfociti T CD4 sono stati stimolati con anti-CD3 (1 µg/mL) in presenza o assenza di GL50Ig (10 µg/mL), B7-1Ig (3 µg/mL), o GL50Ig + B7-1Ig, in presenza o assenza di IL2 (20 U/mL). L'incorporazione di ³H-TdR è stata valutata come in precedenza, l'espressione di ICOS è stata valutata dopo 65 ore di coltura.

Bibliografia

- [1] Janeway CA jr, and Golstein, P. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr. Opin. Immunol.* 1993. 5:313-23.
- [2] Janeway CA jr , and Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte response. *Cell.* 1994. 76:275-85.
- [3] Dianzani U, and Malavasi F. Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit Rev Immunol.* 1995. 15:167-200.
- [4] 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.
- [5] Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity.* 1997. 7:445-50.
- [6] Watts TH and DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Cur Opin Immunol .*1999, 11:286-93
- [7] Dustin ML and Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science.* 1999.283:649-50.
- [8] Xavier R. and Seed B. Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol.* 1999. 11:265-269.
- [9] Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocytes costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* 1999. 283:680-82.
- [10] Acuto, O., and D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu.Rev. Immunol.*
- [11] 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.
- [12] 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.

- [13] 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.
- [14] Donatella Buonfiglio, Manuela Bragardo, Valter Redoglia, Rosanna Vaschetto, Flavia Bottarel, Sara Bonisconi, Thea Bensi, Caterina Mezzatesta, Charles A. Janeway jr. and Umberto Dianzani. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 3463–3467.
- [15] 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
- [16] 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.
- [17] Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliot GS, Hiu A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*.1999. 402:827-32.
- [18] 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.
- [19] Nurieva RI, Duong J, Kishikawa H, Dianzani U, Rojo JM, Ho I, Flavell RA, Dong C. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity*. 2003 Jun;18(6):801-11.
- [20] Yagi J, Arimura Y, Dianzani U, Uede T, Okamoto T, Uchiyama T. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol.* 2003 Jul 15;171(2):783-94.
- [21] James L. Riley, Patrick J. Blair, John T. Musser, Ryo Abe, Katsunari Tezuka, Takashi Tsuji, and Carl H. June.] ICOS Costimulation Requires IL-2 and Can Be Prevented by CTLA-4 Engagement. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 4943–4948.

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

Corsi seguiti

- Basi molecolari del funzionamento delle cellule e dei tessuti. Coordinatori: Prof. Gaudino e Santoro.
- Corso di Statistica Medica. Coordinatore: Prof. Migliaretti.
- Corso d'Inglese Scientifico e Presentazione dei Dati.
- Corso di Statistica. Coordinatore: Prof. Magnani.
- Approccio allo studio dei geni di suscettibilità alle malattie multifattoriali. Prof. Sandra D'Alfonso.

Seminari seguiti

Anno 2001/02

5 dicembre 2001	Prof. Claudio Brancolini PROTEOLISI ED APOPTOSI: CASPASI 2 UN ENZIMA IN CERCA DI IDENTITA'
8 marzo 2002	Prof. Lorenzo Moretta FUNZIONI DELLE CELLULE NK
6 maggio 2002	Dott. Luca Bini L'APPROCCIO PROTEOMICO IN BIOMEDICINA
13 maggio 2002	Dr. Gianluca Damonte ANALISI DI METABOLITI DA MATRICI BIOLOGICHE MEDIANTE TECNICHE DI HPLC/SPETTROMETRIA DI MASSA
4 giugno 2002	Dr. Enzo Merler ANDAMENTO TEMPORALE DELLA MORTALITÀ E INCIDENZA DEL MESOTELIOMA IN EUROPA
4 giugno 2002	Prof. Corrado Magnani STUDI EPIDEMIOLOGICI SULL'EZIOLOGIA DEL MESOTELIOMA PLEURICO IN PIEMONTE
27 giugno 2002	Prof Roberto Marzari LE LIBRERIE ANTICORPALI FAGICHE NELLO STUDIO DELLE PATOLOGIE AUTOIMMUNI
4 luglio 2002	Dr. Laura Hertel Inibizione funzionale di cellule dendritiche mature post infezione da Citomegalovirus umano

Anno 2002/03

- 19 dicembre 2002 Prof. Chen Dong
Regulation of immune responses by novel costimulatory molecules
Dr.ssa Roetto
Clonaggio posizionale applicato alle malattie da alterato metabolismo
del ferro
- 23 Gennaio 2003 Prof. Gianluca Gaidano
Applicazioni di medicina molecolare alla diagnosi e prognosi
- 28 Gennaio 2003 Dr. Daniela Cilloni
Strategie di valutazione della malattia minima residua in
Oncoematologia
- 29 Gennaio 2003 Dr. Ennio ONGINI
FARMACI INNOVATIVI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE
NEURODEGENERATIVE
- 30 Gennaio 2003 Prof. Martino Introna
Meccanismi molecolari d'azione degli anticorpi terapeutici
- 27 febbraio 2003 Prof. Furia
"La Drosophila melanogaster come sistema modello: l'esempio del
gene minifly."
- 18 Marzo 2003 Dr. Anne Boullerne
"Multiplex role of Nitric Oxide in Multiple Sclerosis"
- 16 aprile 2003
Aspetti e caratterizzazione del peptide Tat in cellule epiteliali
- 22 Maggio 2003 Dr.ssa Stefania Bottardi
Developmental stage-specific epigenetic control of human beta
globin gene expression is set in multipotent hematopoietic
progenitor cells
- 18 Giugno 2003 Prof. Fabrizio Loreni
Regolazione traduzionale dell'espressione genica: micro RNA e
sintesi dei ribosomi

Anno 2003/04

- 30 gennaio 2004 Prof. Magnus INGELMAN-SUNDBERG
Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy
- 18 Febbraio 2004 BICE CHINI
LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE
- 10 marzo 2004 Prof. Guido Valesini
TNF, anti-TNF ed autoimmunità
- 31 Marzo 2004 Dr ANTONIA FOLLENZI
Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori
lentivirali
- 3 maggio 2004 Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT
"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS)
subtypes"
Alberto MARTINI
- 20 maggio 2004 Le artriti croniche del bambino
Antonio PUCCETTI
- 25 maggio 2004 Virus e malattie autoimmuni
- 28 maggio 2004 ANGIOLO BENEDETTI
IL RETICOLO ENDOPLASMATICO UN LABIRINTO METABOLICO
- 18 Febbraio 2004 BICE CHINI
LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE
- 14 giugno 2004 PROF. DAVID MURPHY
- 15 giugno 2004 BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS:
PRINCIPLES, PROSPECT AND PROBLEMS.
FUNCIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY.
- 29 giugno 2004 Prof. Emilio Hirsch
PI 3-KINASE γ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY
THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS
- 30 giugno 2004 Manlio FERRARINI
Meccanismi patogenetici della
Leucemia Linfatica Cronica
Rita Clementi
ALTERAZIONI DEL GENE DELLA PERFORINA NELLE PATOLOGIE
LINFOPROLIFERATIVE

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI NAZIONALI:

Costimulation by H4/ICOS induces an atypical cytokine network in human CD4⁺ naïve T cells. **Mesturini R.**, Chiocchetti A., Bensi T., Sametti S., Pellati S., Dianzani U.
3rd national congress SIICA, Ischia, April 24-27, 2004.

Involvement of the osteopontin gene in development of autoimmune/lymphoproliferative patterns. A. Chiocchetti, M. Indelicato, T. Bensi, **R. Mesturini**, S. Sametti, M. Mangolini, L. Castelli, C. Santoro, U. Dianzani.
2nd national congress SIICA, Verona, May 28-31, 2003.

CD-38 derived soluble peptides inhibit HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the envelope glycoprotein gp120. T. Bensi, **R. Mesturini**, S. Pellati, A. Chiocchetti, F. Malavasi, A. Savarino, U. Dianzani.
2nd national congress SIICA, Verona, May 28-31, 2003.

1st National Conference SIICA, Montecatini Terme May 8-11, 2002.

PUBBLICAZIONI

1. Lombardi G, Miglio G, Dianzani C, **Mesturini R**, Varsaldi F, Chiocchetti A, Dianzani U, Fantozzi R. Glutamate modulation of human lymphocyte growth: in vitro studies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 28;318(2):496-502
2. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, **Mesturini R**, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacopelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood.* 2004 Feb 15;103(4):1376-82.
3. Dianzani U, Bensi T, Savarino A, Sametti S, Indelicato M, **Mesturini R**, Chiocchetti A. Role of FAS in HIV infection. *Curr HIV Res.* 2003 Oct;1(4):405-17.
4. Savarino A, Bensi T, Chiocchetti A, Bottarel F, **Mesturini R**, Ferrero E, Calosso L, Deaglio S, Ortolan E, Butto S, Cafaro A, Katada T, Ensoli B, Malavasi F, Dianzani U. Human CD38 interferes with HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):461-3.