

INDICE

Premessa

1 Introduzione

1.1 I linfociti T

1.1.1 Il complesso del T cell receptor

1.1.2 Linfociti T helper (CD4⁺) e linfociti T citotossici (CD8⁺)

1.1.3 Selezione timica

1.2 Attivazione dei linfociti T Helper

1.2.1 Attivazione linfocitaria

1.2.2 La sinapsi immunologica e l'organizzazione del signalosoma

1.3 Recettori Costimolatori e Inibitori

1.3.1 La Famiglia del CD28

1.3.2 Trasduzione del segnale mediata da CD3 e CD28

1.4 Differenziamento dei linfociti T Helper

1.5 Controllo dell'autoimmunità

1.5.1 Attivazione o anergia? Un ruolo chiave per NFAT

1.5.2 Apoptosi, o morte cellulare programmata

1.5.3 Linfociti Soppressori

2 ICOS coopera con CD28, IL-2, ed IFN- γ , modulando l'attivazione di linfociti naive CD4⁺

2.1 La molecola costimolatoria H4/ICOS

2.2 Scopo del lavoro

2.3 Materiali e metodi

2.4 Risultati

2.4.1 Ruolo della costimolazione mediata da ICOS in linfociti naive CD4⁺.

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

2.4.3 Ruolo della costimolazione mediata da ICOS in assenza dello stimolo mediato da CD28.

2.4.4 Effetto del costimolo mediato da ICOS nella secrezione di TGF- β 1 ed espressione di FoxP3

2.5 Discussione

2.6 Figure relative al lavoro

2 Elevati livelli di Osteopontina associati a polimorfismi nel gene, sono un fattore di rischio per lo sviluppo di autoimmunita'/linfoproliferazione

2.7 Introduzione

2.7.1 ALSP e DALD

2.7.2 Osteopontina

2.8 Scopo del lavoro

2.9 Risultati e Discussione

2.10 Figure relative al lavoro

3 Aplotipi nel gene di Osteopontina sono correlati a sviluppo e progressione della Sclerosi Multipla

2.11 Introduzione

2.11.1 Sclerosi multipla

2.11.2 Osteopontina e Sclerosi multipla

2.12 Scopo del lavoro

2.13 Risultati e Discussione

2.14 Figure relative al lavoro

5 Bibliografia

6 Pubblicazioni ottenute

Premessa

Il sistema immunitario adattativo dei vertebrati ha evoluto la capacità di neutralizzare organismi patogeni in continua evoluzione. Il successo della difesa dell'organismo è dovuto alla generazione di un enorme numero di recettori antigenici, capaci di riconoscere antigeni estranei, ed innescare una risposta immunitaria contro il l'organismo bersaglio.

La generazione della vasta diversità recettoriale, ha come conseguenza il possibile sviluppo di autoimmunità in seguito al riconoscimento di un antigene self come estraneo. Per limitare questo rischio, esistono meccanismi dedicati allo sviluppo della tolleranza, ovvero la capacità di non indurre una risposta verso molecole self.

Per garantire lo sviluppo della tolleranza al self, una serie di eventi accompagnano la maturazione dei linfociti nel midollo osseo e nel timo (tolleranza centrale) e garantiscono l'omeostasi dei linfociti in periferia (tolleranza periferica). Durante la maturazione si ha l'eliminazione di cellule autoreattive per apoptosi, ma questa selezione, per quanto accurata, non garantisce la rimozione completa dei linfociti autoreattivi. Linfociti autoreattivi si trovano quindi nel sangue periferico di soggetti sani, e sono controllati continuamente da meccanismi di tolleranza periferica quali: anergia, apoptosi, soppressione mediata da T regolatorie.

Causa principale nello sviluppo di una patologia autoimmune è una tolleranza al self inefficace; le cause di questo fenomeno non sono ancora ben definite, ma pare chiaro che l'autoimmunità risulti dalla combinazione di fattori genetici ed ambientali (per esempio infezioni).

Mutazioni o polimorfismi possono influenzare espressione e/o funzione di una proteina; questi difetti hanno un impatto notevole nel rischio dello sviluppo di

autoimmunità', specialmente se sono interessati geni che codificano per citochine o molecole coinvolte nello spegnimento della risposta immunitaria.

A livello periferico, una delle strategie per garantire l'innescamento e lo spegnimento della risposta immunitaria, consiste nella necessità di segnali aggiuntivi a quello mediato dal recettore antigenico, che ne potenziano o inibiscono gli effetti. Citochine e costimolatori recettoriali appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, tra questi CD28, CTLA-4 ed HV1/ICOS, occupano un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria.

Queste molecole inducono segnali positivi che stimolano l'espansione clonale, la produzione di citochine o il differenziamento in linfociti effettori, ma possono anche indurre segnali negativi, volti ad attenuare o terminare la risposta immunitaria.

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'attivazione linfocitaria, è fondamentale per poter sviluppare nuove immuno-terapie. Terapie basate sulla manipolazione dei segnali trasmessi dai costimolatori di membrana, potrebbero essere mirate a promuovere la risposta immunitaria nei confronti di organismi patogeni e tumori, o a ridurre il rischio di rigetto di trapianti e malattie autoimmuni.

Durante il corso di dottorato, mi sono dedicato principalmente allo studio del ruolo della molecola costimolatoria HV1/ICOS, nell'indurre l'attivazione di linfociti T CD4⁺ naive, e nella modulazione di segnali extracellulari mediati da citochine nelle prime fasi del differenziamento del linfocita. Questo lavoro non è ancora pubblicato ed è pertanto descritto in dettaglio in questa tesi.

Ho inoltre partecipato allo sviluppo di alcuni progetti paralleli che hanno portato a varie pubblicazioni elencate nella sezione finale della tesi. Tra questi, nella tesi includo quelli che hanno portato all'identificazione della citochina osteopontina come nuovo fattore capace di costimolare la risposta immunitaria e di funzionare da fattore predisponente

per lo sviluppo di malattie autoimmuni. Questi lavori sono presentati nella tesi nella forma di una descrizione sintetica di ciascun lavoro che viene premessa alla versione originale del lavoro pubblicato.

1 Introduzione

1.1 I linfociti T

1.1.1 *Il complesso del T cell receptor*

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 una 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, e 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 in quanto 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 del segnale mediata da TCR dipende dall'associazione delle catene α e β del TCR con le cinque catene polipeptidiche monomorfe del CD3: γ , δ , ϵ , ζ e η . 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 (*Src Homology region 2*), dando avvio alla trasduzione del segnale.

La catena ζ del CD3, e' presente come omodimero o come eterodimero se associato alla sua variante di η . La catena ζ ha una ridotta regione extracellulare e contiene tre motivi ITAM nella coda citoplasmatica.

Quindi, il complesso TCR-CD3 è formato da quattro dimeri: uno del TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) e tre del CD3 ($\gamma\epsilon$; $\delta\epsilon$; $\zeta\zeta$ o $\zeta\eta$) [1].

1.1.2 Linfociti T helper (CD4⁺) e linfociti T citotossici (CD8⁺)

I linfociti T maturi esprimono 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, favorendo l'adesione dei linfociti T ristretti per MHC alle APC o alle cellule bersaglio. 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 partecipano agli eventi precoci di trasduzione del segnale che si verificano a seguito all'interazione MHC-peptide/TCR-CD3. 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 [2-3].

1.1.3 Selezione timica

I linfociti T si sviluppano a partire da cellule staminali del midollo osseo, tuttavia, diversamente dalle cellule B, i progenitori precoci T migrano nel timo, organo linfoide centrale che costituisce il microambiente specializzato in cui ha luogo la loro maturazione. Con la maturazione timica la cellula T esprime in membrana il T Cell Receptor (TCR). La maturazione dei linfociti T nel timo avviene attraverso un processo simile a quello dei linfociti B, reso però più complicato dal fatto che i linfociti T riconoscono solo peptidi presentati da molecole MHC autologhe espresse dalle cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B, o dalle cellule bersaglio. Pertanto il processo di maturazione prevede che il timocita debba: 1) riarrangiare i geni per la porzione variabile della catena β (frammenti V, D, J) e della α (frammenti V e J) del TCR; 2) controllare che il TCR prodotto sia adatto al riconoscimento di peptidi presentati dalle molecole MHC autologhe, processo noto

come *selezione positiva* dei timociti; 3) controllare di non essere autoreattivo, cioè di non riconoscere peptidi autologhi presentati dalle molecole MHC autologhe, processo noto come *selezione negativa* dei timociti [4].

Nel timo i linfociti T immaturi, o timociti, proliferano e si differenziano passando attraverso una serie di stadi fenotipici identificabili in base all'espressione superficiale del complesso CD3/TCR e dei corecettori CD4 e CD8. Allo stadio di progenitori i timociti subcapsulari non esprimono né il recettore per l'antigene, né molecole corecettoriali CD4 e CD8, e vengono definiti "cellule doppiamente negative" (DN); esistono quattro stadi di maturazione DN (da DN1 a DN4), durante le quali l'attivazione dei geni RAG-1 e RAG-2 porta al riarrangiamento del TCR. Timociti allo stadio DN1 proliferano ed iniziano il riarrangiamento dei geni per la porzione variabile della catena β . Nei timociti allo stadio DN3 si forma il complesso pre-TCR, dato dall'associazione della catena β e della catena pre-TCR α . Durante il passaggio dallo stadio DN4 allo stadio DP (cellule doppiamente positive, CD4⁺CD8⁺) i geni RAG-1 e RAG-2 riarrangiano i geni per la porzione variabile della catena α , e si ha l'espressione dell'eterodimero $\alpha\beta$ TCR.

Tutti i timociti immaturi sono programmati per andare incontro a morte cellulare programmata (MCP), e solo quelli che riarrangiano efficacemente il TCR ed esprimono un TCR in grado di interagire con le molecole MHC autologhe, espresse dalle cellule epiteliali della corteccia timica (cTEC), ricevono un segnale di sopravvivenza che blocca la MCP (selezione positiva) [5]. I timociti così selezionati, hanno ricevuto il segnale per passare dallo stadio DP a SP (positive a CD4 o CD8), ed esprimere il recettore CCR7 ed altre molecole che ne permettono la migrazione nella zona midollare del timo. Qui i timociti interagiscono con DCs e cellule epiteliali della midollo timico (mTEC). I timociti che riconoscono peptidi autologhi presentati dalle molecole MHC

autologhe ricevono un segnale di MCP e vengono deleti (selezione negativa). I timociti sopravvissuti maturano a linfociti T, vengono rilasciati nel sangue e circolano nei tessuti linfatici secondari. Questo meccanismo fa sì che i linfociti T periferici riconoscano peptidi estranei presentati dalle molecole MHC autologhe e che nel timo muoiano oltre il 95% dei timociti, ovvero i timociti inutili perché falliscono il riarrangiamento del TCR o perché esprimono un TCR incapace di interagire con il MHC autologo, e i timociti dannosi perché autoreattivi. In realtà, per quanto efficienti, questi meccanismi di tolleranza centrale non eliminano tutti i linfociti autoreattivi, sono quindi necessari meccanismi di tolleranza periferica ad indurre tolleranza al self nei linfociti che incontrano per la prima volta un antigene self ma specifico [6-10].

1.2 Attivazione dei linfociti T Helper

1.2.1 Attivazione linfocitaria

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 [2-3]. 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 del doppio segnale, i linfociti T necessitano, affinché siano indotte proliferazione e differenziamento in cellule effettrici, di due distinti segnali: il primo è fornito in seguito all'interazione del complesso MHC-peptide (presente sulla superficie delle APC) con il TCR ed i corecettori CD4 e CD8; il secondo è fornito da molecole costimolatorie che interagiscono con specifici ligandi espressi sulle APC.

L'esposizione dei linfociti ai complessi MHC-antigene in assenza del segnale costimolatorio induce uno stato di anergia. Le molecole costimolatorie modulano, potenziando (costimolatori positivi) o frenando (costimolatori negativi), la risposta del TCR all'antigene [11].

La costimolazione positiva, agisce abbassando il livello di soglia d'attivazione linfocitaria, definito dal numero di TCR che devono essere stimolati per avere una risposta biologica. In condizioni di basse concentrazioni di antigene, od in presenza di antigene con scarsa capacità immunogena, la costimolazione è essenziale nell'innescare l'attivazione linfocitaria [12].

CD28 è la molecola con funzione costimolatoria positiva meglio caratterizzata, sia a livello funzionale sia molecolare, e riveste il ruolo più importante nell'indurre l'attivazione di linfociti naive. Nell'uomo, CD28 è costitutivamente espresso dal 90% dei linfociti Th CD4⁺, e dal 50% dei linfociti Tc CD8⁺, questo ha indotto a pensare che vie costimolatorie aggiuntive siano importanti in alcune risposte immunitarie CD28-indipendenti. Tra i recettori che possono giocare un ruolo costimolatorio sono emersi LFA-I, SLAM, e recentemente HVEM/ICOS (*inducible costimulator*), il terzo membro della famiglia di CD28.

Queste molecole, con i rispettivi ligandi, sono espresse da diverse sottopopolazioni cellulari, e sembrano agire a differenti stadi dell'attivazione/differenziamento 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.

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 (*Fas*) e CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), e la perdita della funzione di ciascuna di queste due molecole induce patologie caratterizzate da linfoproliferazione e sviluppo di malattie autoimmuni.

Le molecole costimolatorie di maggior rilievo sono appartenenti, o alla superfamiglia delle immunoglobuline (che attualmente comprende CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, e BTLA) o alla superfamiglia del TNFR/TNF (tra queste CD40L, OX-40, CD27, 4-1BB, CD30 ed HVEM). 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[11,13].

1.2.2 La sinapsi immunologica e l'organizzazione del signalosoma

Negli ultimi anni è stato proposto che la riorganizzazione delle proteine di membrana nello "SMAC" (*supramolecular activation cluster*), all'interfaccia linfocita T-APC, abbia un ruolo importante nel modulare, e probabilmente terminare, il signaling durante l'attivazione linfocitaria. La giunzione tra i due tipi cellulari è stata denominata *sinapsi immunologica*, ed è composta da un central SMAC (*c-SMAC*) nel quale si trovano TCR, CD2, CD28, PKC θ , Lck, Fyn, CD4, and CD8, ed un peripheral SMAC (*p-SMAC*) nel quale si trovano Talina ed LFA-1 [14].

Secondo questo modello lo SMAC formatosi creerebbe una sorta di filtro molecolare, capace di selezionare le molecole coinvolte nel contatto cellula T/APC (per esempio CD43 è escluso). Questo tipo di selezione fisica permetterebbe la regolazione dell'attivazione linfocitaria, attraverso la modulazione delle componenti della piattaforma recettoriale. Elemento chiave nella formazione di questa struttura simil-sinaptica, è la presenza di raft lipidici nello strato esterno della membrana plasmatica. I raft lipidici sono microdomini costituiti da sfingolipidi e colesterolo, arricchiti di proteine GPI-linked, e sono dispersi nel mosaico fluido dei fosfolipidi di membrana; questi clusters sono strutture compatte e dinamiche che si formano grazie alle forti interazioni laterali sfingolipide-sfingolipide e sfingolipide-colesterolo [15]. Dati sperimentali hanno dimostrato che i raft lipidici sono ricchi di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (CD4, CD8, LAT, PAG, Lck e Fyn), e che la composizione delle proteine ed essi associate, cambia durante l'attivazione linfocitaria. Non è ancora chiaro, invece, se in un linfocita quiescente il TCR sia residente nei rafts; sembra invece chiaro che in seguito ad ingaggio del TCR, le proteine ZAP-70, PLC γ , Vav, PKC θ , e PKB entrino a far parte di queste strutture. Esperimenti condotti in condizioni

fisiologiche di attivazione, tramite l'uso di APC, hanno infine suggerito che CD28 può avere un ruolo chiave nell'indurre l'aggregazione dei raft e la formazione dello SMAC, probabilmente inducendo la riorganizzazione dell'actina [16-17].

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.

1.3 Recettori Costimolatori e Inibitori

1.3.1 La famiglia del CD28

Le molecole della famiglia del CD28 sono caratterizzate da un singolo dominio IgV-like ed una breve coda citoplasmatica. CD28, CTLA-4 (CD152) e ICOS mappano, nell'uomo, nella regione cromosomica 2q33, questo suggerisce che i tre geni siano originati da duplicazione genica [18].

Queste tre molecole sono presenti in membrana come omodimeri, grazie a legami disolfuro tra residui di Cisteine nella regione extracellulare in posizione membrano-prossimale. Presentano un motivo comune nella porzione intracitoplasmatica, Tyr-Xaa-Xaa-Met. In particolare si hanno 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 della subunita' adattatrice p85 di PI3K; questo rappresenta il principale meccanismo di reclutamento in membrana di tale chinasi. CD28 puo' inoltre legare Grb-2 tramite il residuo Asn, responsabile dell'esclusiva capacita' di indurre IL-2, e tramite domini ricchi in Prolina la chinasi Itk (IL-2 inducible T-cell kinase) ed Lck. Anche CTLA-4, a differenza di ICOS, presenta domini ricchi in Prolina ma un ligando per questi non e' stato ancora individuato [18-21].

CD28 e CTLA-4 presentano lo stesso motivo MYPPPY nella porzione extracellulare, che e' responsabile dell'interazione con i ligandi, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86); ICOS, presenta invece il motivo FDPPPF, responsabile del legame con il suo unico recettore, B7h (B7rp1, GL50, B7H2, LICOS) [22-24].

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 agisce in sinergia con i segnali mediati dal TCR, modulando la regolazione genica indotta dal solo TCR, e potenziando le risposte T all'antigene [25-26]. L'effetto di tale stimolo porta a proliferazione cellulare, grazie alla forte induzione di IL-2, ed 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 [27-29]. 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*) [30-32].

Le molecole B7 sono presenti sulla superficie di APC professioniste (*Antigen Presenting Cell*), quali cellule dendritiche (DCs), macrofagi e linfociti B attivati. Da un punto di vista funzionale B7.1 e B7.2 possono essere distinguibili più per una diversa cinetica d'espressione, che per una diversa trasduzione del segnale indotta nel linfocita. B7.1 è espresso da DC solo in seguito ad attivazione, B7.2 è già espresso a bassi livelli da DC inattivate, e rapidamente indotto in seguito ad attivazione.

H4/ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia del CD28. E' 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 [29].

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*) e' un recettore monomero, e come CTLA-4, inibisce la proliferazione mediata dall'attivazione del TCR nei linfociti T e la produzione di citochine; e' 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*) [33-39].

BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*), anch'esso monomero, e' espresso in seguito ad attivazione dai linfociti T, e da linfociti B quiescenti o attivati. Il meccanismo dell'inibizione mediata da BTLA, e' probabilmente da attribuirsi, come per PD-1, al reclutamento delle fosfatasi SHP1 e SHP2. Il ligando per questo recettore non e' ancora noto [40-41].

1.3.2 Trasduzione del segnale

L'interazione tra TCR e complesso peptide-MHC induce la traslocazione dei corecettori (CD4 o CD8) nei pressi del TCR. La presenza del corecettore è importante, in quanto porta la Tirosina chinasi Lck, associata al dominio intracellulare del corecettore, nei pressi delle porzioni citoplasmatiche del complesso TCR/CD3.

La fosforilazione mediata da Lck e Fyn delle ITAMs sulle catene CD3 ζ , crea un sito di legame per il dominio SH2 della Tirosina chinasi ZAP-70 (Tyrosine kinase ζ -associated protein of 70 kDa), che a sua volta è fosforilata ed attivata dalle Src chinasi. ZAP-70 fosforila la molecola adattatoria LAT (linker for activation of T cells), creando così siti di ancoraggio per l'enzima fosfolipasi PLC- γ 1, e per i complessi Grb-2/SOS e Gads/SLP-76 (SH2 domain-containing phosphoprotein of 76 kDa). Altre molecole si aggregano successivamente ad SLP-76, di queste: Vav (guanine-nucleotide exchange factor for small GTPases), WASP (via Nck), coinvolta nella polimerizzazione dell'actina, e le Tirosina chinasi Itk e Tec, necessarie ad un'attivazione ottimale di PLC- γ 1 [43-49].

PLC- γ 1 idrolizza PI(4,5)P₂ (fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato) producendo i secondi messaggeri DAG (diacilglicerolo) ed IP₃ (inositolo 3-fosfato). Il DAG consente alla Serina/Treonina chinasi PKC θ (lipide dipendente e Calcio indipendente) di associarsi alla membrana, e di regolare la via del segnale che porta ad attivazione di NF- κ B.

In particolare PKC θ attiva IKK (I κ B-Kinase), che inducendo la degradazione di I κ B (inibitore di NF- κ B) rende possibile la traslocazione di NF- κ B nel nucleo

. PKC θ sembra inoltre coinvolta nell'attivazione di JNK, che fosforilando Jun nel nucleo, rende possibile la formazione del fattore trascrizionale AP-1 (Jun/Fos) [50-52].

L'attività di small G protein ha un ruolo predominante nell'attivare le MKKK che portano ad attivazione delle MAP chinasi ERK, JNK, e p38.

L'attivazione di ERK (extracellular signal-regulated protein kinase)

è guidata da Ras (*small G protein*). L'attività di Ras è innescata dallo scambiatore di nucleotidi Guanidinici SOS (Son Of Sevenless homolog), ed attiva la cascata di fosforilazioni che coinvolge Raf, MAPKK ed infine ERK. L'attivazione di JNK e p38 è invece guidata da small G protein della famiglia Rho, tra queste Rac e Cdc42.

Mentre ERK sembra coinvolto nel differenziamento di linfociti Th2, JNK ed p38 potrebbero essere importanti nel differenziamento di linfociti effettori Th1; p38, inoltre, partecipa all'induzione di IFN- γ [53].

Il secondo messaggero IP₃, generato da PLC- γ 1, induce l'attivazione delle vie di trasduzione associate al Ca²⁺. IP₃ induce il rilascio nel citoplasma di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico, che a sua volta agisce sui canali CRAC (*calcium release-activated calcium*) sulla membrana cellulare, permettendo l'ingresso di Ca²⁺ dall'ambiente extracellulare [54]. Lo ione Calcio si associa alla Calmodulina, che attiva la Serina/Treonina fosfatasi Calcineurina. NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) è defosforilato da questa fosfatasi e trasloca nel nucleo, qui può interagire con altri fattori di trascrizione, tra cui AP-1 ed indurre l'attivazione di diversi geni [55-58].

La costimolazione modula le vie del segnale indotte dal recettore antigenico. La molecola costimolatoria meglio caratterizzata è CD28, il cui ingaggio rinforza i segnali indotti dal TCR, come già accennato in precedenza.

Dal punto di vista del signaling, l'interazione CD28/B7, induce la fosforilazione della Tyr del motivo YMNM, di CD28, da parte di Lck e Fyn. Si crea così un sito di legame per il complesso Grb2/SLP76, in grado di reclutare a sua volta altre molecole, per la

chinasi I κ k, che incrementa l'attivazione di PLC- γ 1, e per la subunità adattatrice p85 della chinasi PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*),

La via del segnale della chinasi PI3K, puo' essere attivata dal TCR anche in assenza di costimolo, ma e' fortemente potenziata dai costimolatori CD28 ed ICOS.

PI3K, agendo su PI(4,5)P₂, produce PI(3,4,5)P₃, che consente a diverse di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale di associarsi alla membrana. Tra queste, la Serina/Treonina chinasi Akt, e Vav-1, che innesca la GTPasi Rac1, coinvolta nella riorganizzazione dell'actina.

L'effetto costimolatorio di CD28 avviene quindi potenziando in particolare l'induzione di AP-1, via PLC- γ 1/PKC θ /MAKP, ed NF- κ B, via PKC θ e via PI3K/Akt [59-62].

1.4 Differenziamento dei linfociti T Helper

In seguito al riconoscimento del complesso MHC/peptide espresso da una cellula dendritica in un organo linfoide secondario, TCR e CD28 innescano, nel linfocita naive, la produzione di IL-2 e l'ingresso nel ciclo cellulare. Dopo alcuni giorni di intensa proliferazione, i linfociti Th differenziano in linfociti effettori, distinguibili in base al profilo d'espressione citochinico. Sono state individuate due classi di linfociti effettori: Th1 e Th2 [63].

I linfociti Th1 producono IL-2 e citochine pro-infiammatorie, tra cui IFN- γ , TNF- α e Linfotossina- α ; questi possono indurre attivazione dei macrofagi ed ipersensibilita' di tipo ritardato (DTH, delayed-type hypersensitivity), che caratterizzano la risposta immunitaria cellulo-mediata. Effettori Th1 conferiscono immunita' verso patogeni intracellulari, tra cui i protozoi della specie *Leishmania* e *Toxoplasma gondii*. I linfociti Th2 producono invece IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ed IL-13, e mediano la risposta detta immunita' umorale; istruiscono i linfociti B a differenziare in plasmacellule secernenti anticorpi, e promuovono reazioni di ipersensibilita' di tipo immediato. Gli effettori Th2 rivestono un ruolo importante nella risposta verso parassiti extracellulari, tra cui elminti intestinali, e sono coinvolti nelle reazioni asmatiche [64].

In seguito al differenziamento, Th1 e Th2 down-regolano il recettore CCR7, necessario all'homing nei linfonodi, ed esprimono recettori per chemochine infiammatorie, che guidano la migrazione verso tessuti infiammati.

Diversi fattori di trascrizione guidano l'espressione citochinica di tipo Th1 o Th2.

Il fattore di trascrizione T-bet (*T-box transcription factor*) e' importante nello sviluppo di effettori Th1, ed e' espresso in seguito ad attivazione del linfocita in presenza di IFN- γ [65]. T-bet, induce il rimodellamento del locus di IFN- γ , rendendolo accessibile

ad NFAT ed NF- κ B, e l'espressione della subunita' β 2 del recettore per IL-12; le vie del segnale indotte dal TCR e dalle citochine IL-12 ed IL-18, possono indurre cosi' intensa sintesi di IFN- γ .

Il sistema immunitario innato ha un ruolo essenziale nel fornire le citochine necessarie allo sviluppo di linfociti effettori Th1. IFN- γ e' probabilmente prodotta da NK attivate, mentre IL-12 e' prodotta da macrofagi o dendritiche attivati [68].

Il fattore di trascrizione GATA-3 e' invece indotto in linfociti naive attivati in presenza di IL-4, ed e' cruciale nell'indurre il differenziamento Th2 [66]. GATA-3 induce il rimodellamento del locus di IL-4, rendendolo accessibile a fattori di trascrizione indotti dal TCR, tra cui NFAT, AP-1 e c-Maf (fattore specifico della classe Th2) [67-68].

Per lo sviluppo di effettori Th2 sembra importante l'assenza di attivazione del sistema immunitario innato, e l'assenza quindi dell'effetto inibitorio mediato da IFN- γ ed IL-12 su tale differenziamento. E' stato proposto che le NKT fossero fonte dell'IL-4 necessaria ad iniziare il processo di differenziamento, ma dati recenti hanno spostato l'attenzione su segnali alternativi che potrebbero innescare l'iniziale produzione di IL-4; tra questi IL-6 ed il recettore B7h (ligando di ICOS) espressi da cellule dendritiche mature [68].

1.5 Controllo dell'autoimmunita'

1.5.1 Attivazione o anergia? Un ruolo chiave per NFAT

In linfociti stimolati dal complesso MHC/peptide e dalla molecola B7, i fattori di trascrizione NFAT, AP-1, NF- κ B ed altri sono attivati. L'azione di questi fattori di trascrizione e' richiesta per la produzione di citochine, per la funzione helper nei confronti di linfociti B, e per indurre AICD (activation-induced cell death) tramite l'espressione di FasL. L'espressione della maggior parte di questi geni e' dipendente dalla collaborazione di NFAT ed AP-1.

Il segnale mediato dal TCR, in assenza di costimolo, non e' in grado di indurre piena attivazione di AP-1 ed NF- κ B, mentre induce bassi livelli di Calcio sufficienti ad attivare NFAT e la trascrizione genica che ne dipende.

Recentemente, e' stato proposto che in queste condizioni, NFAT possa lavorare indipendentemente da AP-1, ed induca la trascrizione di regolatori negativi, tra cui proteasi, fosfatasi, repressori trascrizionali ed E3 ubiquitin ligasi [69-70].

Quest'ultima classe di proteine, media l'inibizione del signaling prossimale mediato dal TCR quando il linfocita anergico viene ristimolato, promuovendo la degradazione di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale.

In conclusione, e' possibile che un basso livello di stimolazione antigenica induca la via di trasduzione Ca^{2+} -Calcineurina-NFAT a stimolare regolatori negativi, che rendono il linfocita anergico, incapace cioe' di rispondere ad una successiva ristimolazione antigenica. Questo meccanismo puo' quindi avere un ruolo chiave nel limitare l'espansione di linfociti autoreattivi.

1.5.2 Apoptosi, o morte cellulare programmata

L'apoptosi, o morte cellulare programmata (MCP), tramite diversi meccanismi molecolari, svolge un importante ruolo nello spegnimento della risposta immunitaria. Questo sistema di controllo impedisce che nel corso della vita dell'individuo, le successive stimolazioni del sistema portino ad un accumulo di cloni autoreattivi con conseguente sviluppo di malattie autoimmuni.

Due sistemi possono portare all'apoptosi dei linfociti attivati nel corso della risposta immunitaria: uno "passivo" e uno "attivo".

Il primo sistema è legato alla fine della stimolazione da parte dell'antigene, eliminato dalla risposta immunitaria stessa, che porta ad una ridotta produzione di citochine e ad una morte legata alla sospensione dei relativi stimoli di sopravvivenza (morte per "cytokine withdrawal"). Questo sistema spiega lo spegnimento della risposta immune in seguito ad una efficace eliminazione dell'antigene.

Per contro, una prolungata stimolazione dei linfociti T in divisione porta anch'essa alla induzione di apoptosi legata all'attivazione di recettori pro-apoptotici sensibilizzati dalla attivazione linfocitaria stessa. La morte causata da una stimolazione ripetuta del TCR è detta "activation-induced cell death" (AICD) e sembra ridurre la probabilità che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole "self" simili alle molecole esogene bersaglio della risposta. Questa cross-reattività della risposta immunitaria è considerata uno dei meccanismi più frequentemente coinvolti nello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detta "mimetismo molecolare". L'apoptosi attiva è innescata dalla stimolazione di "recettori di morte" di superficie. Il sistema di "recettori di morte" meglio caratterizzato per lo spegnimento della risposta immunitaria è il sistema Fas/FasL.

Le citochine giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'apoptosi dei linfociti T [71]. Infatti la forma passiva può essere impedita da citochine di crescita come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Viceversa la forma attiva è favorita dalla IL-2, la cui presenza ad alte concentrazioni sensibilizza l'attività dei recettori proapoptotici. L'accumulo di linfociti T attivati nei topi "knock-out" per l'IL-2 o il per suo recettore può quindi essere dovuto all'effetto proliferativo mediato da altre citochine, non contrastate dall'azione dell'IL-2 [72].

Il recettore Fas

Fas (CD95/Apo1) è un recettore transmembrana di 45-48 kD di tipo I [73-74]. È espresso dalla maggior parte dei tessuti e appartiene alla superfamiglia dei "tumor necrosis factor receptors" (TNFR), una vasta famiglia di recettori coinvolti nello sviluppo e nella maturazione dei linfociti. Una classificazione di questa famiglia individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e per questo chiamati *recettori di morte (death receptors)* [75]. I "death receptors" comprendono, oltre a Fas, TNFR1, TNFR2, TRAIL (TNF-related- apoptosis-inducing-ligand) e il recettore per la linfotossina (LT) [76].

Tutti i "death receptors" presentano caratteristiche strutturali comuni. Essi comprendono una porzione intracitoplasmatica, definita "*death domain*", necessaria per la trasmissione del segnale di morte.

Il sistema Fas/FasL è il sistema meglio caratterizzato a livello molecolare nello spegnimento della risposta immunitaria [77-78]. Esso in realtà svolge due ruoli fondamentali: 1) è uno dei meccanismi attraverso cui i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio; 2) linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e

sono quindi sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL.

Il legame tra Fas e FasL determina la trimerizzazione di tre monomeri di Fas attraverso i *death domains*. Il trimero può legare diverse molecole ed innescare un'attivazione a cascata di caspasi, cioè cisteino-proteasi che scindono i loro substrati in corrispondenza di residui aspartici sul sito carbossilico attivando vie apoptotiche distinte.

Sono state individuate mutazioni recessive a carico dei geni che codificano per Fas e per FasL, nei topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) rispettivamente [79]. Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano linfadenopatia e splenomegalia e una malattia autoimmune generalizzata con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite e accumulo non neoplastico di linfociti T $TCR\alpha/\beta^+ CD4^-CD8^-$ doppi negativi (DN) negli organi linfoidi secondari.

Le manifestazioni autoimmuni e l'iperproliferazione linfocitaria di questi animali è probabilmente legata al difettoso spegnimento della risposta immune da parte di Fas, che porta da un lato all'accumulo dei linfociti nel corso di attivazioni successive del sistema e dall'altro all'espansione di cloni autoimmuni.

Nell'uomo è stata descritta una patologia con quadro simile ai topi *lpr* denominata *sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS)* [80-83].

1.5.3 Linfociti T soppressori

La presenza di linfociti T periferici autoreattivi in persone sane, indica l'importanza di meccanismi regolatori che prevengano patologie autoimmuni. La presenza di linfociti T regolatori rappresenta una delle strategie nell'indurre tolleranza al self ed omeostasi linfocitaria a livello periferico.

Negli ultimi anni si è tentato di definire diverse sottopopolazioni T regolatorie in base a fenotipo, origine e meccanismo d'azione. Sfortunatamente non sono ancora stati identificati marcatori unici per queste popolazioni linfocitarie, ed i meccanismi d'azione proposti grazie a saggi *in vitro*, a volte, non ricapitolano in modo adeguato quanto accade a livello fisiologico. Inoltre le differenze tra uomo e topo, in particolare per questo aspetto dell'immunologia, complicano l'interpretazione di studi su modelli animali.

In base alle conoscenze attuali, le popolazioni regolatorie meglio definite nell'uomo sono:

- Tr1, chiamati T regolatori adattativi (*aTr, peripheral adaptive Tr*); possono essere indotti in periferia sia nell'uomo sia nel topo, e sopprimere proliferazione di linfociti T effettori in maniera antigene specifica, e dipendente o non dalle citochine secrete.
- nTreg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, che si sviluppano nel Timo (*naturally arising Treg*), e controllano autoimmunità organo specifica in maniera antigene non specifica, dipendente da contatto.

Tr1

Linfociti Tr1 non sono ancora identificabili tramite recettori di superficie, ma solo per un'espressione citochinica unica, che differisce da linfociti effettori Th1 e Th2. In particolare, in seguito ad attivazione producono IFN- γ , TGF- β , IL-5 ed alti livelli di IL-10; IL-2 e' prodotta in piccole quantita', mentre IL-4 non e' espressa. Tramite la secrezione delle citochine immunomodulatorie IL-10 e TGF- β , le Tr1 possono sopprimere risposte primarie e secondarie dei linfociti T, ma e' possibile che altri meccanismi siano coinvolti nella soppressione mediata da questa popolazione.

E' stato recentemente dimostrato che cellule dendritiche allogene immature possono indurre differenziamento in linfociti Tr1, e che in questo processo IL-10 ha un ruolo cruciale. Resta ancora da definire quale sia il ruolo dei recettori della famiglia B7 nell'induzione di queste T regolatorie; dendritiche di diverse sottopopolazioni o a differente stadio maturativo, possono presentare infatti un profilo unico d'espressione di questi recettori [84].

nTreg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺

La popolazione linfocitaria Tr CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e' stata inizialmente definita grazie all'espressione costitutiva della catena α del recettore per IL-2.

In seguito e' stato dimostrato che il fattore di trascrizione FoxP3 (*forkhead box protein P3*) e' necessario e sufficiente per lo sviluppo e per le funzioni soppressorie, ed e' l'unico marker specifico per queste Treg [85-87].

Mutazioni in FoxP3 sono responsabili del fenotipo *scurfy* nel topo, caratterizzato dall'assenza di CD4⁺CD25⁺ Treg, e morte precoce in seguito a linfoproliferazione di linfociti CD4 effettori [88]. La sindrome umana IPEX (*immune dysfunction/polyendocrinopathy/enteropathy/X-linked*) ha caratteristiche simili al fenotipo *scurfy*, e

mutazioni nel gene FoxP3 sono state trovate [89-90]. Questi dati hanno suggerito che le Treg FoxP3⁺, hanno un ruolo essenziale nel prevenire malattie autoimmuni.

Tuttora non e' chiaro se siano indotte nel Timo in seguito ad interazione ad alta affinita' con l'antigene (sfuggendo a selezione negativa), o se derivino da un precursore specifico; la prima possibilita' pare tuttora piu' verosimile. Questa popolazione costituisce l'8-12% ed il 3-5% dei linfociti CD4⁺ nel topo e nell'uomo rispettivamente.

Sono stati proposti in passato diversi meccanismi con cui queste Treg possono mediare la soppressione, ma nessuno sembra chiarire in modo definitivo il fenomeno; tra questi la produzione di IL-10, la presenza di TGF- β in membrana, e l'interazione di CTLA-4 con molecole B7 espresse su linfociti. Recentemente e' stato invece proposto il meccanismo che pare rispecchiare meglio la realta', ovvero l'interazione di queste Treg FoxP3⁺ con cellule dendritiche, potrebbe inibire il successivo priming di linfociti effettori o naive da parte delle DCs stesse [91].

Lo studio di questa popolazione e' resa complicata non solo dalla mancanza di un marcatore di superficie, ma anche da alcune differenze tra uomo e topo nella regolazione dell'espressione di FoxP3 stesso. Nell'uomo, la presenza della popolazione CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ derivante dal Timo, con caratteristiche simili a quella murina, e' stata confermata da diverse evidenze sperimentali. E' stato inoltre dimostrato che linfociti umani CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻, se stimolati via CD3 e CD28 possono esprimere FoxP3 ed acquisire proprieta' soppressorie, un dato questo in nessun modo riscontrato nel topo [92].

Nell'uomo quindi sembrano due le popolazioni Tregs FoxP3⁺. Una e' generata nel timo, e' autoreattiva, e coinvolta nella protezione da risposte autoimmunitarie generate in periferia da linfociti effettori autoreattivi. L'altra popolazione puo' essere generata da linfociti CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻, e non sembra distinguibile da quella derivante dal

Timo; la funzione di queste Treg indotte non e' stata ancora provata, ma potrebbero limitare l'attivazione di T bystander nel sito di risposta immunitaria.

2 *ICOS coopera con CD28, IL-2, ed IFN- γ , modulando l'attivazione di linfociti naive CD4⁺*

2.1 *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 [93-94]. Successivamente è stato descritto il clonaggio nell'uomo di una nuova molecola costimolatoria, denominata ICOS (*inducible T cell costimulator*), espressa selettivamente da linfociti T attivati [95]. Nel nostro laboratorio è stato poi dimostrato che H4 ed ICOS sono la stessa molecola [96]. H4/ICOS intensifica tutte le risposte basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di citochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula.

ICOS mappa nella regione cromosomica 2q33, come CD28 e CTLA-4, ed in base all'omologia di sequenza, rappresenta il terzo membro della famiglia del CD28. La sequenza aminoacidica di ICOS mostra il 27% di identità con CD28.

ICOS è una molecola transmembrana di tipo I, ed è espressa in forma monomerica o come omodimero; nell'uomo 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. 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. La

forma dimerica ICOS ha un peso molecolare apparente di 55-60 kDa, mentre le singole catene 27-29 kDa.

La parte citoplasmatica lega la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) tramite il motivo Tyr-Met-Phe-Met, fino ad ora non sono stati identificati altri interattori della molecola; si pensa quindi che la costimolazione mediata da ICOS sia per lo più dipendente da PI3K, la cui attività è stimolata in misura maggiore rispetto a CD28 [106].

Pur appartenendo alla stessa famiglia, CD28 e ICOS si differenziano in alcuni importanti aspetti. CD28 è espresso costitutivamente sulla superficie dei linfociti T, ICOS viene espresso solo in seguito all'attivazione linfocitaria, come CTLA-4; la molecola è già espressa 24 ore dopo l'attivazione. Entrambe inducono la sintesi di citochine (IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α), ma soltanto CD28 stimola la sintesi di IL-2 ed IL-9 [97]. Inoltre ICOS non lega i ligandi di CD28 e CTLA-4, B7-1 (CD80), e B7-2 (CD86), ma lega la molecola B7-h (detta anche B7rp1, GL50, B7H2 o LICOS), l'unico ligando di ICOS (e viceversa). B7h è espresso da linfociti B, monociti e dendritiche, ma anche da APCs non professioniste quali fibrociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali dei tubuli renali e cellule staminali embrionali. [100-105].

L'interazione di ICOS con il suo ligando gioca un ruolo importante nella cooperazione linfociti B/linfociti T; in particolare ICOS ha un ruolo nel differenziamento e nello sviluppo della memoria dei linfociti B, nello switch isotipico delle immunoglobuline, e nella formazione dei centri germinali [106-108]. Queste evidenze sono state confermate dal fenotipo tra pazienti con immunodeficienza comune variabile che presentavano perdita omozigote di ICOS [109].

È possibile proporre un modello per tale interazione. Inizialmente il legame di CD28 con i ligandi B7-1 o B7-2 espressi dai linfociti B, avvia la comunicazione B/T; contemporaneamente è indotta l'espressione di ICOS, la cui interazione col ligando

modula la produzione citochinica dei linfociti T, favorendo soprattutto la produzione di IL-4 e IL-10; in una terza fase, viene espresso CTLA-4 che opera un'azione negativa sull'attivazione del linfocita T.

Diverse evidenze sperimentali hanno suggerito un ruolo di ICOS nello sviluppo di effettori Th2. ICOS e' espresso sia da effettori Th1 sia da Th2, ma risulta maggiormente espresso in lifociti Th2, e l'assenza dell'interazione ICOS/B7h favorisce in vitro il differenziamento di linfociti Th1 [106-108, 110-113].

Inoltre, assenza della costimolazione mediata da ICOS, aumenta la suscettibilita' allo sviluppo di EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*), malattia autoimmune Th1-mediata, e diminuisce la risposta a *N. brasiliensis*, e le reazioni allergiche delle vie aeree, risposte di tipo Th2 [114-115]. Esistono comunque dati che suggeriscono un ruolo per ICOS nello sviluppo di una risposta Th1. Per esempio il knock-out di ICOS mostra resistenza all'artrite indotta da collagene, il modello murino dell'artrite reumatoide, per un difetto nella produzione di IL-17 da parte dei linfociti CD4⁺ [118]. Inoltre bloccando in vivo l'interazione ICOS/B7h, si e' osservato che il rigetto in modelli di allotrapianto poteva essere accelerato o frenato, a seconda delle condizioni sperimentali [119, 120].

Infine, sempre da lavori sul topo, e' stato dimostrato che ICOS puo' innescare un loop a feedback positivo con IL-4. In particolare, la secrezione iniziale di IL-4 puo' indurre l'espressione di ICOS, la quale a sua volta potenzia l'espressione di c-Maf ed IL-4 nella fase effettrice [121, 123]. E' stato inoltre ipotizzato un ruolo nel differenziamento di T regolatorie caratterizzate da elevata espressione di IL-10 [116, 123].

Nell'uomo l'espressione di ICOS sembra invece up-regolata da IL-12 ed IL-23, ed e' piu' alta in linfociti Th1 rispetto a linfociti Th2; sembra inoltre che non abbia nessun ruolo nel differenziamento Th1/Th2 [124-125].

Il ruolo di ICOS nei linfociti CD8⁺ e' stato meno caratterizzato, ma si e' ipotizzata un ruolo nella risposta anti-tumorale e nella risposta verso patogeni intracellulari [126-129].

2.2 Scopo del lavoro

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

2.3 *Materiali e metodi*

- Purificazione di linfociti ed immunofluorescenza

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, Gaithersburg, MD), + 10% FBS (v/v) (Fetal Bovine Serum) (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 40 mg/ml di gentamicina, penicillina, streptomina.

La purificazione dei linfociti naive T CD4⁺ è stata ottenuta mediante una prima rimozione per “panning” delle cellule CD11b⁺, HLA-DR⁺ (classe II), CD45RO⁺, e dal successivo utilizzo del CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany).

La purezza delle cellule CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD14⁺CD16⁺ era circa del 97%, come stabilito mediante immunofluorescenza diretta e analisi citofluorimetrica.

I seguenti anticorpi sono stati utilizzati nella tecnica del panning OKM1 (CD11b), L243 (HLA-DR), UCHL1 (CD45RO); questi sono stati purificati per cromatografia d'affinità su proteina G-Sepharose 4 fast-flow columns (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany) dal supernatante della coltura del corrispondente ibridoma.

- Anticorpi monoclonali ed immunofluorescenza

Negli esperimenti di immunofluorescenza sono stati usati i seguenti anticorpi: anti-CD3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), -CD25, -CD8, -CD14, HLA-DR (Caltag, Burlingame, CA), -CD56 (Becton Dickinson, San Jose, CA), coniugati con PE, ed anti-CD45RA, -CD45RO, -CD4 (Sigma), -CD19 (Caltag), -CTLA-4 (R&D System, Minneapolis, MN) coniugati con FITC. Per rilevare H4/ICOS sono stati usati C398.4A

(prodotto nel nostro laboratorio e purificato come descritto in precedenza) con goat anti-hamster Ig coniugato con FITC (Caltag).

- *Attivazione cellulare ed analisi delle citochine*

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, penicillina, streptomina.

Il mAb anti-CD3 (OKT3) le proteine di fusione Recombinant Human B7-1/Fc Chimera e Human GL50-mIg (R&D System) ed anti-CTLA-4 (Ansell, Bayport, MN) sono stati usati in adesione alle concentrazioni indicate su piastre da 96 pozzetti a fondo piatto. I linfociti sono stati seminati in triplicato a 1×10^5 cellule/pozzetto in 200 μ l di terreno in presenza di concentrazioni titolate degli appropriati stimoli. Le cellule sono state incubate per 72 ore, e le ultime 6 ore con timidina triziata [3 H]-TdR (1 μ Ci/ pozzetto) (Amersham), quindi sacrificate ed analizzate al contatore- β (Wallac-Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

Dove indicato sono stati inoltre usati gli anticorpi bloccanti anti-IFN- γ (20 μ g/ml) ed anti-IL-2 (20 μ g/ml) Ab (R&D Systems), e le citochine ricombinanti IFN- γ (80 ng/ml), IL-4 (2 ng/ml) (R&D Systems) ed IL-2 (2 U/ml) (Sigma-Aldrich).

Per il dosaggio delle citochine, i supernatanti sono stati raccolti dopo 65 ore di coltura, ed 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.

La concentrazione di TGF- β 1 e’ stata valutata tramite ELISA (R&D Systems), a tale scopo in questi esperimenti i linfociti sono stati coltivati in serum-free medium AIM-V (Gibco, Invitrogen, Gatthersburg, MD).

- *Western blot*

2×10^6 linfociti per pozzetto sono stati coltivati in 2 ml di terreno in piastre a sei pozzetti con anticorpi stimolanti usati in adesione. In questi esperimenti e’ stato usato anti-CD28 mAb (clone ANC28.1/5D10) (Ansell, Bayport, MN). Dopo 72 ore di coltura I linfociti sono stati lavati due volte con PBS, lisati 20 min in ghiaccio in AKT buffer (10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl -pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, Aprotinin 1 μ g/ml, Leupeptin 1 μ g/ml, Pepstatin A 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml). I lisati sono stati poi centrifugati per 10 min at 13000 rpm a 4°C, denaturati in SDS-PAGE Loading Buffer (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% Glycerol, 1% SDS, 2.5% bromophenol-blue), e separati su gels 10% SDS-PAGE. I gels sono stati trasferiti su filtri di nitrocellulosa successivamente bloccati con TBST buffer al 5% latte per 1 ora,

ed incubati con 2 $\mu\text{g/ml}$ di goat anti-human FoxP3 policlonale (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight a 4°C in TBST buffer/5% BSA. FoxP3 è stato rilevato con anticorpo secondario anti-goat HRP-labeled (1:400, Santa Cruz Biotechnology) ed ECL system (Amersham). β -actina è stata successivamente rilevata come controllo interno con mouse anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) ed anticorpo secondario anti-mouse HRP-labeled (1:3000, Amersham Biosciences).

2.4 Risultati

2.4.1 Ruolo della costimolazione mediata da ICOS in linfociti naïve CD4⁺.

Allo scopo di valutare la costimolazione mediata da ICOS in linfociti naïve CD4⁺, abbiamo valutato la costimolazione indotta da CD28, ICOS o entrambi utilizzando proteine le chimeriche B7.1-Ig e GL50-Ig su linfociti attivati con dosi crescenti di anti-CD3 mAb (0.1-10 µg/ml). Secrezione citochinica (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ e TNF-α), espressione di ICOS e CD25, e proliferazione cellulare sono state valutate dopo 72 ore di coltura. I risultati hanno mostrato che uno stimolo ottimale mediato da CD3+CD28 (OKT3 1 µg/ml, B7.1-Ig 4 µg/ml) induceva proliferazione (Fig. 2.1B), espressione di CD25 ed ICOS (Fig. 2.1C), e secrezione di IL-2, IFN-γ, e TNF-α, bassi livelli di IL-5 ed IL-10 (Fig. 2.1A), mentre IL-4 non era rilevabile (non mostrato). L'ingaggio contemporaneo di CD3+CD28+ICOS ha mostrato che ICOS potenziava la secrezione di IL-10 (5 volte), IL-2 (5 volte), IFN-γ (4 volte), TNF-α (2 volte), e IL-5 (2 volte), mentre IL-4 non era rilevabile; in queste condizioni proliferazione ed espressione di ICOS e CD25 risultavano incrementate. Gli stimoli mediati da CD3 o CD3+ICOS non inducevano proliferazione linfocitaria o secrezione citochinica, mentre l'espressione di CD25 ed ICOS erano debolmente indotte dal costimolo mediato da ICOS. Poiché B7.1 è un ligando sia di CD28 sia di CTLA-4, abbiamo effettuato gli stessi esperimenti in presenza di anticorpi bloccanti CTLA-4 per verificare se questo recettore influenzasse l'attivazione linfocitaria nelle condizioni utilizzate. I risultati mostravano che bloccando CTLA-4, la costimolazione, mediata da CD28 da solo o in combinazione con ICOS, non era influenzata. Infine, CTLA-4 non risultava rilevabile in linfociti Th naïve, e soltanto debolmente espresso dopo tre giorni di coltura.

Questi dati suggeriscono che ICOS contribuisce all'attivazione primaria di linfociti umani naïve Th grazie ad una sinergia con CD28.

2.4.2 Ruolo di IFN- γ ed IL-2 nella costimolazione mediata da ICOS in linfociti Th naïve

La forte secrezione di IFN- γ ed IL-2 indotta da ICOS in linfociti stimolati da CD3+CD28, ci ha indotti a valutare il ruolo di queste citochine tramite l'uso degli anticorpi neutralizzanti anti-IFN- γ o anti-IL-2.

In questi esperimenti per meglio valutare l'effetto della costimolazione mediata da ICOS abbiamo utilizzato dosi ottimali di GL50-Ig e B7.1-Ig come in precedenza, con dosi subottimali di anti-CD3 (0.1 μ g/ml) (Fig. 2). I risultati mostravano che in queste condizioni la stimolazione di CD3 e CD28 non induceva secrezioni di quantità rilevabili di citochine (Fig. 2A) o proliferazione cellulare (Fig. 2B), ed induceva un basso livello d'espressione di ICOS (Fig. 2C). Per contro, l'associazione di ICOS a questi stimoli portava i tre parametri valutati a livelli comparabili a quelli ottenuti con stimolazioni ottimali. In queste condizioni sperimentali la costimolazione mediata da ICOS si dimostrava così un terzo segnale essenziale per l'attivazione linfocitaria. La neutralizzazione di IL-2 o IFN- γ con anticorpi bloccanti inibiva fortemente la proliferazione (Fig. 2.2B) e l'espressione di ICOS (Fig. 2.2C); inoltre l'anticorpo anti-IL-2 inibiva la secrezione di tutte citochine, mentre quello anti-IFN γ inibiva la secrezione delle citochine Th1 TNF- α ed IL-2 ed incrementava la secrezione delle citochine Th2, IL-5 ed IL-10 (Fig. 2.2A).

Nei linfociti Th naïve di topo, tra IL-4 ed ICOS si instaura un loop a feedback positivo in cui IL-4 induce l'espressione di ICOS, il cui ingaggio aumenta la secrezione di IL-4. Questo meccanismo non pare riscontrabile nell'uomo, infatti IL-4 non era rilevabile in nessuna condizione di coltura (non mostrato). Abbiamo comunque valutato direttamente l'effetto di IL4 sull'espressione di ICOS aggiungendo 2 ng/ml di IL-4 ai

linfociti stimolati via CD3+CD28 o CD3+CD28+ICOS. I risultati mostravano che tale trattamento inibiva sostanzialmente l'espressione di ICOS (Fig 2.3), mentre dosi inferiori IL-4 (0.2 ng/ml) non avevano effetti (non mostrato).

Questi risultati suggeriscono che sia IFN- γ sia IL-2, ma non IL-4, giocano un ruolo positivo nel costimolo mediato da ICOS in presenza di un debole stimolo mediato da CD3+CD28.

2.4.3 Ruolo della costimolazione mediata da ICOS in assenza dello stimolo mediato da CD28

Per indagare ulteriormente il ruolo di IL-2 ed IFN- γ nell'attivazione indotta da ICOS, abbiamo utilizzato condizioni d'attivazione in assenza d'ingaggio di CD28; abbiamo quindi usato un'alta dose di anti-CD3 (10 μ g/ml), che contemporaneamente allo stimolo indotto da GL50-Ig induceva debole attivazione di linfociti Th naïve. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza o assenza di IFN- γ ed IL-2 esogene, per valutare se queste citochine fossero state in grado di indurre una completa attivazione linfocitaria. Per valutare il ruolo della secrezione endogena di IFN- γ sono stati condotti esperimenti in presenza di anti-IFN- γ .

L'ingaggio di ICOS, in assenza di citochine esogene, induceva una parziale attivazione cellulare, caratterizzata da proliferazione cellulare (Fig. 2.4B), ed up-regolazione di ICOS (Fig. 2.4C) ed CD25 (non mostrato), con secrezione di basse dosi di IL-2, IFN- γ , IL-10 e TNF- α (Fig. 2.4A); questo suggeriva l'induzione di deboli funzioni effettrici.

Con IL-2 esogena nel terreno di coltura la proliferazione linfocitaria, la secrezione di IL-10, IFN- γ , TNF- α ed IL-2 stessa, l'espressione di ICOS, risultavano fortemente incrementate, con valori simili a quelli indotti dalla stimolazione di CD3+CD28+ICOS (Fig. 2.4). IFN- γ esogeno risultava incrementare in maniera meno efficace i parametri valutati, in particolare mentre aumentava la secrezione di TNF- α ed IL-2, IL-10 era meno espressa (Fig. 2.4). In assenza di IL-2 esogena, la neutralizzazione di IFN- γ endogeno inibiva la proliferazione cellulare, l'espressione di ICOS e secrezione di IL-2, TNF- α , ed IL-10. In presenza di IL-2 esogena, invece, anti-IFN- γ inibiva la secrezione di IL-2 e TNF- α ma aumentava la produzione di IL-10 e non aveva effetti su proliferazione o espressione della molecola.

2.3.4 Effetto del costimolo mediato da ICOS nella secrezione di TGF- β 1 ed espressione di FoxP3

La forte secrezione di IL-10 indotta dall'ingaggio di CD3+ICOS, in presenza o assenza di IL-2 esogena, suggerisce che ICOS possa favorire il differenziamento verso linfociti Tr1 (type 1 regulatory T cells), i quali producono alte dosi di IL-10. Per chiarire il ruolo di ICOS nel possibile differenziamento verso un fenotipo regolatorio, abbiamo valutato la secrezione di TGF- β 1 e l'espressione FoxP3, i quali caratterizzano rispettivamente linfociti Th3 e Treg (naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells). Questi esperimenti sono stati condotti usando forti dosi di anti-CD3 (10 μ g/ml).

La produzione di TGF- β 1 stata valutata su i) linfociti stimolati via CD3, CD3+ICOS in presenza o assenza di IL-2 e/o anti-IFN- γ . Gli esperimenti sono stati effettuati in terreno serum-free poiche' il siero bovino contiene TGF- β 1. Il solo stimolo mediato da CD3 non induceva produzione di TGF- β 1, ma con il contemporaneo ingaggio di ICOS abbiamo rilevato la secrezione di questa citochina, che era incrementata in presenza di IL-2 esogena. Infine l'aggiunta di anti-IFN- γ incrementava la secrezione di TGF- β 1 da parte di linfociti attivati via CD3+ICOS (Fig. 2.5A).

L'espressione di FoxP3 e' stata valutata dopo 72 ore di coltura, su:

- i) linfociti stimolati via CD3, CD3+ICOS o CD3+CD28 per confrontare l'effetto dei due stimoli costimolatori;
- ii) linfociti stimolati via CD3+CD28+ICOS o CD3+ICOS+IL-2 per valutare l'effetto di una stimolazione ottimale.

I risultati mostrano che la stimolazione CD3+ICOS induce livelli d'espressione di FoxP3 paragonabili a quelli indotti da CD3+CD28. L'uso di IL-2 esogena, o il contemporaneo ingaggio di CD3, ICOS e CD28 non sembrano incrementare

l'espressione di FoxP3; inoltre il stimolo indotto da anti-CD3 non induceva livelli rilevabili della proteina (Fig. 2.5B).

2.5 *Discussione*

Lo scopo di questa parte di lavoro è stato valutare il ruolo di ICOS nell'attivazione e nel differenziamento di linfociti naïve Th e la sua cooperazione con la costimolazione indotta da CD28 usando ligandi fisiologici di queste molecole. Nella maggior parte dei lavori i) il ruolo di ICOS è stato valutato sia nel topo sia nell'uomo in linfociti CD4 totali, e ii) ICOS è stato stimolato tramite anticorpi monoclonali, che possono indurre segnali in parte diversi da quelli generati dall'ingaggio mediato dal ligando naturale. Abbiamo osservato infatti che due anticorpi monoclonali anti-ICOS (i.e. C398.4A ed F44) riconoscevano epitopi parzialmente distinti e mostravano effetti parzialmente differenti nell'attivazione linfocitaria.

In lavori precedenti è stato proposto che il ruolo di ICOS nella costimolazione dei linfociti fosse determinante nell'attivazione di linfociti memoria durante una risposta immunitaria secondaria, mentre nell'attivazione primaria di linfociti T naïve, fosse CD28 la molecola costimolatoria predominante. In linea con questa possibilità, ICOS è quasi assente nei T naïve, inoltre alcuni gruppi hanno mostrato la costimolazione non induce produzione di IL-2, e non supporta quindi l'espansione di linfociti precursori Th.

I nostri risultati mostrano che ICOS può agire come terzo segnale inducendo una rapida e piena attivazione linfocitaria, ed influenzando il differenziamento di linfociti T CD4⁺ umani naïve stimolati via CD3/TCR e CD28. Inoltre, potrebbe essere un fattore chiave nell'innescare l'attivazione linfocitaria cooperando con stimoli sub-ottimali incapaci indurre attivazione cellulare, che possono essere una stimolazione sub-ottimale di CD3+CD28 o la stimolazione di CD3 in presenza di IL-2 esogena. È inoltre noto che B7h è costitutivamente espresso da diversi tipi cellulari di origine ematopoietica e

non, mentre B7.1 e B7.2 sono espresse unicamente da APC professioniste. ICOS puo' quindi avere un ruolo cruciale quando i) B7.1 e B7.2 sono debolmente espresse su APC non pienamente attivate, o ii) IL-2 e' abbondante nel microambiente, in seguito a secrezione da parte di linfociti bystander, in presenza di APC non professioniste esprimenti ICOS ma non B7.1 e B7.2.

In linfociti attivati con stimoli ottimali su CD3 e CD28, l'ingaggio di ICOS mostra un effetto minore sulla proliferazione e sull'espressione di CD25 ed ICOS, gia' fortemente indotti, ma aumenta fortemente la secrezione delle citochine Th1, IFN- γ , TNF- α e IL-2, e Th2, IL-10 e IL-5. Questo suggerisce che ICOS sia importante nel differenziamento dei linfociti Th in cellule effettrici. Questa possibilita' e' sostenuta dai dati ottenuti sui topi ICOS^{-/-} o B7h^{-/-} caratterizzati da un difetto sia nella proliferazione dei linfociti T sia nella secrezione citochinica. Questo e' inoltre in linea con i dati di Wassink et al., secondo cui ICOS potenzia la secrezione citochinica in linfociti differenziati Th1 o Th2 [124].

In assenza dell'ingaggio di CD28 gli stimoli mediati da ICOS e CD3 attivano i linfociti solo parzialmente. L'aggiunta di IL-2 esogena, induce, in queste condizioni, una piena attivazione linfocitaria incrementando i valori di tutti i parametri valutati; tale citochina sembra essere quindi cruciale per la funzione di ICOS. Questa possibilita' e' confermata dall'osservazione che il costimolo mediato da ICOS in linfociti stimolati via CD3+CD28, e' quasi completamente abolita dalla neutralizzazione di IL-2 endogena. Questi dati suggeriscono che la sensibilizzazione mediata da CD28 delle funzioni di ICOS e' principalmente mediata da IL-2, e che alti livelli di IL-2 nel micro-ambiente possono rimpiazzare il bisogno dello stimolo di CD28.

Il forte effetto dovuto al costimolo mediato da ICOS e' abbastanza sorprendente se si considera la debole espressione della molecola in Th naive, ma puo' essere giustificato

dal rapido incremento d'espressione della molecola in seguito ad attivazione. La secrezione di IL-4 non e' mai stata rilevata in nessuna condizione di coltura, e la presenza di IL-4 esogena inibiva l'espressione di ICOS; risultati simili con un diverso modello sperimentale sono stati ottenuti con linfociti umani da Wassink et al. Queste conclusioni sono in contrasto con dati ottenuti nel modello murino in cui ICOS ed IL-4 presentano un loop a feedback positivo [121, 122], mentre nel nostro modello umano, un simile feedback, sostenuto da IL-2, sembra interessare ICOS ed IFN- γ . I risultati ottenuti con questo modello sono in linea con quanto osservato da Wassink et al., secondo il quale l'espressione di ICOS e' potenziata da IL-12, un forte stimolatore dell'espressione di IFN- γ ; questo suggerisce che la stimolazione mediata da ICOS, in linfociti Th umani, possa favorire il differenziamento verso Th1 piuttosto che Th2.

Un ulteriore funzione e' l'effetto che ICOS puo' avere nel differenziamento di linfociti naive T CD4⁺ in cellule regolatorie, considerando che e' ancora da chiarire se i linfociti regolatori siano generati da linfociti naive o da linfociti Th1 o Th2 in seguito a stimolazione cronica [130-137]. Questa possibilita' e' suggerita dal fatto che ICOS induce la produzione di IL-10, in particolare in presenza di IL-2 ed assenza di IFN- γ . E' noto che la secrezione di IL10 ed IFN- γ sia tipica di linfociti regolatori Tr1 [136]. Inoltre, ICOS induce l'espressione di TGF- β 1 e FoxP3, caratteristica dei linfociti regolatori T_{Reg} CD4⁺CD25⁺, con l'espressione di IL-10 [130-137]. E' interessante notare, che sia TGF- β 1 sia FoxP3 sono indotti a livelli considerevoli stimolando CD3 ed ICOS, anche in assenza dell'ingaggio di CD28 o di IL-2 esogena. Questo dato suggerisce che in presenza di stimoli insufficienti all'attivazione, l'ingaggio di ICOS puo' favorire il differenziamento verso cellule con funzioni regolatorie. In linea con questo modello, e' stato proposto che ICOS giochi un ruolo nell'induzione dello stato anergico indotto nel topo dall'inalazione di ovalbumina ed in assenza di segnali

costimolatori indotti da adiuvanti; questa incapacità di risposta da parte dei linfociti sembra coinvolgere linfociti regolatori ed IL-10 [133].

In conclusione, questo lavoro dimostra che ICOS può generare il terzo segnale nell'attivazione linfocitaria, e questo può avere due ruoli. Da una parte, può favorire il differenziamento di linfociti effettori in presenza di una stimolazione ottimale di CD3/TCR (primo segnale) e CD28 (secondo segnale), dall'altro può essere il fattore chiave nell'innescare l'attivazione linfocitaria quando il segnale mediato da CD28 è debole o assente, agendo in sinergia con CD28 o con l'IL-2 presente nel microambiente. Inoltre ICOS potrebbe favorire la risposta a deboli antigeni nel contesto di una risposta immunitaria verso un forte antigene. Questo potrebbe essere importante nello sviluppo di malattie autoimmuni, in cui la risposta ad auto-antigeni deboli può essere favorita da risposte immunitarie a forti antigeni infettivi. L'effetto di ICOS sembra essere sostenuto da un loop a feedback positivo tra IFN- γ ed ICOS, il quale suggerisce che linfociti NK possano favorire la costimolazione mediata da ICOS durante le prime fasi della risposta immunitaria, quando NK attivate sono la principale sorgente di IFN- γ [137]. Da un altro punto di vista, ICOS potrebbe frenare una risposta immunitaria inappropriata, quando gli stimoli attivatori sono insufficienti, inducendo lo sviluppo di linfociti regolatori.

2.6 Figure relative al lavoro

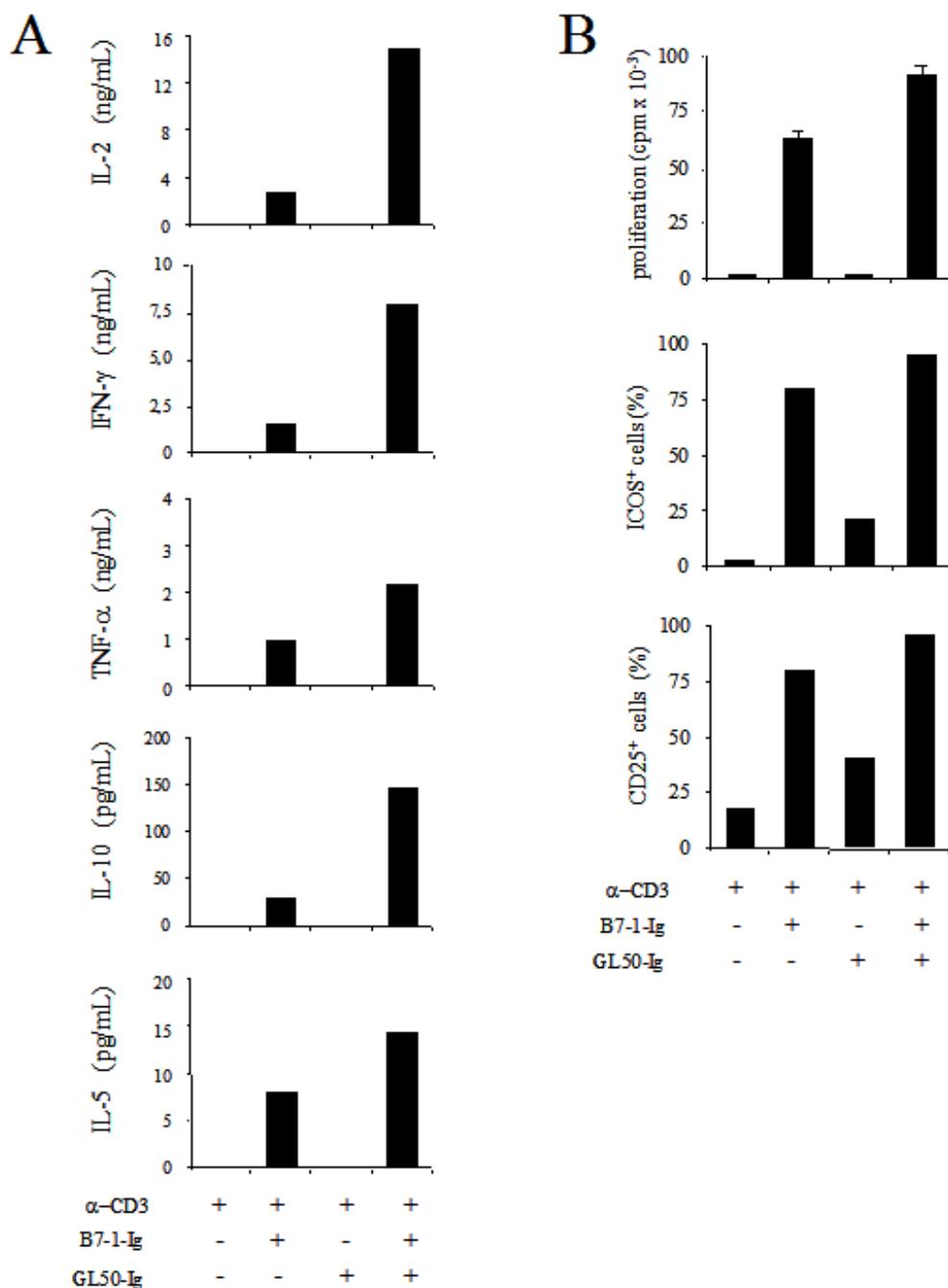


FIGURA 2.1 Costimolazione mediata da ICOS in naïve CD4⁺ T attivati via CD3 e CD28. Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (1 µg/ml) in presenza o assenza di GL50-Ig (5 µg/ml), B7.1-Ig (4 µg/ml), o GL50-Ig + B7.1-Ig. (A) I supernatanti di coltura sono stati raccolti dopo tre giorni di coltura per il saggio citochinico. (B) L'incorporazione di [³H]-TdR durante le ultime 6 ore di tre giorni di coltura e' espressa in cpm (conte per minuto); l'espressione di ICOS e' stata valutata dopo tre giorni di coltura ed e' espressa come percentuale di linfociti ICOS⁺. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di quattro esperimenti indipendenti. Nel saggio di proliferazione, le barre degli errori indicano la deviazione standard relativa a colture in triplicato. Le citochine sono state dosate sulla miscela dei supernatanti di colture allestite in triplicato.

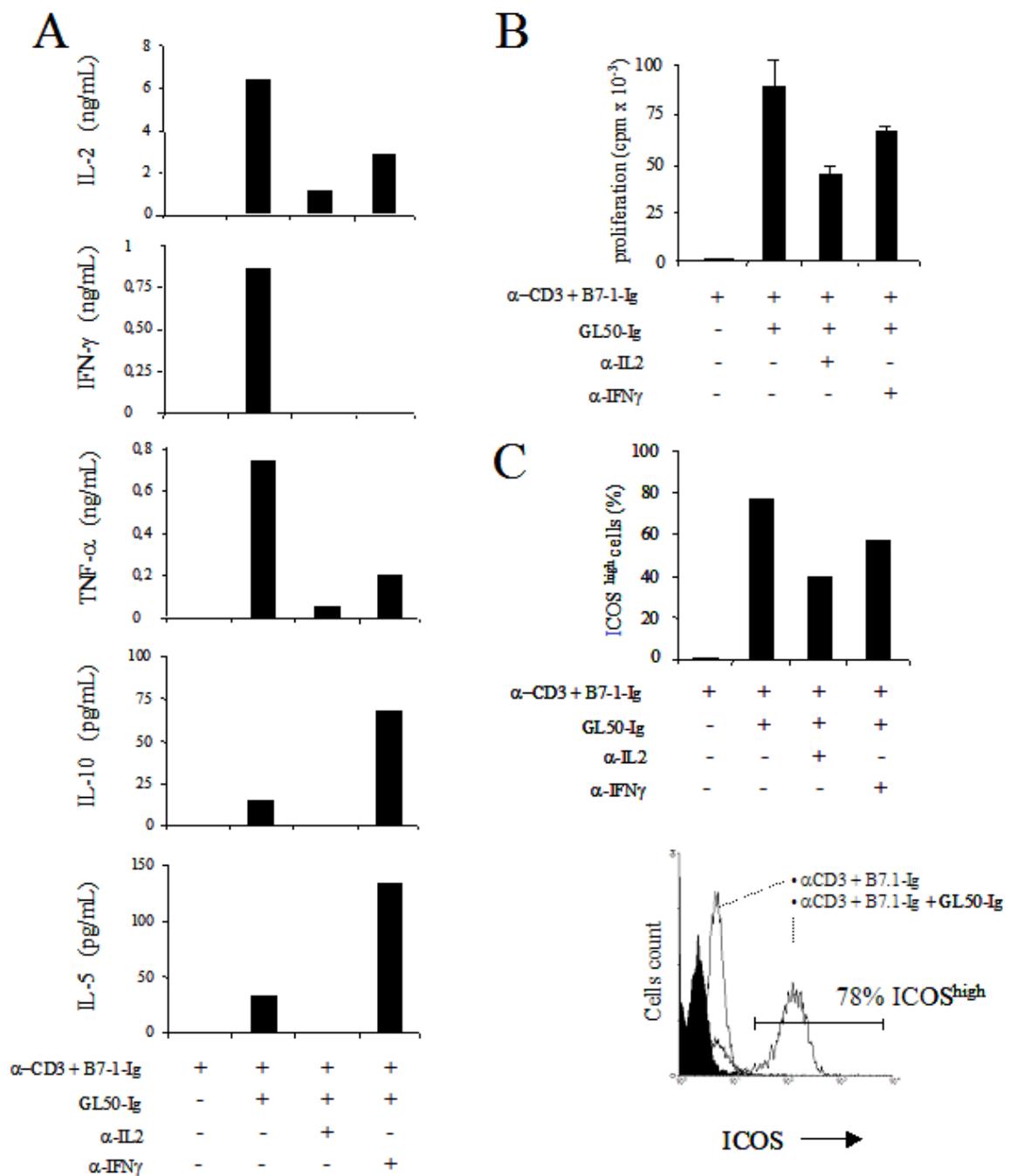


FIGURA 2.2 Ruolo di IFN- γ ed IL-2 nelle funzioni effettrici mediate da ICOS su linfociti naïve CD4⁺ T. Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (0.1 μ g/ml) e B7.1-Ig (4 μ g/ml), in presenza o assenza di GL50-Ig (5 μ g/ml), anti-IL-2 o anti-IFN- γ (20 μ g/ml). (A) Livelli citochinici (B) saggio di proliferazione sono stati eseguiti come in Figura 1. (C) L'espressione di ICOS e' stata valutata dopo tre giorni di coltura ed e' espressa come percentuale di linfociti con alti livelli di ICOS (ICOS^{high}), come mostrato dagli istogrammi citofluorimetrici (open curves: espressione della molecola in diverse condizioni d'attivazione; shaded curve: controllo negativo). I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. Nel saggio di proliferazione, le barre degli errori indicano la deviazione standard relativa a colture in triplicato. Le citochine sono state dosate sulla miscela dei supernatanti di colture allestite in triplicato.

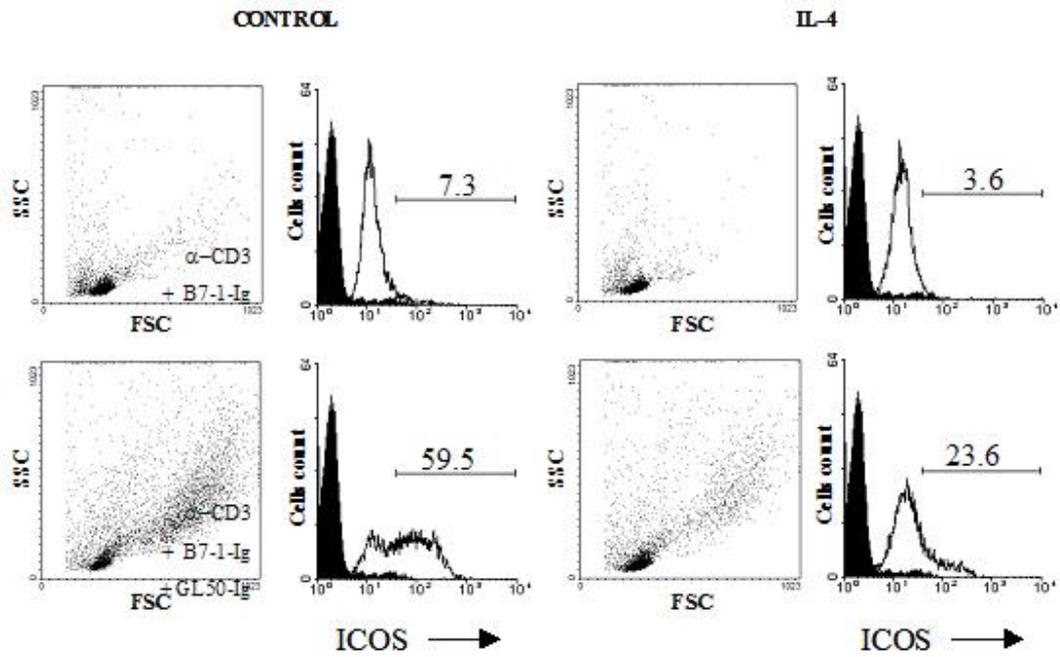


FIGURA 2.3 Effetto di IL-4 esogena sull'espressione di ICOS. Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (0.1 µg/ml) e B7.1-Ig (4 µg/ml), in presenza o assenza di GL50-Ig (5 µg/ml) e IL-4 (2 ng/ml). L'espressione di ICOS (bianco) ed il controllo (nero) e' stata valutata dopo tre giorni di coltura. Il marker posizionato come in figura 2C, e la percentuale di linfociti ICOS^{high} e' indicata dal numero. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti.

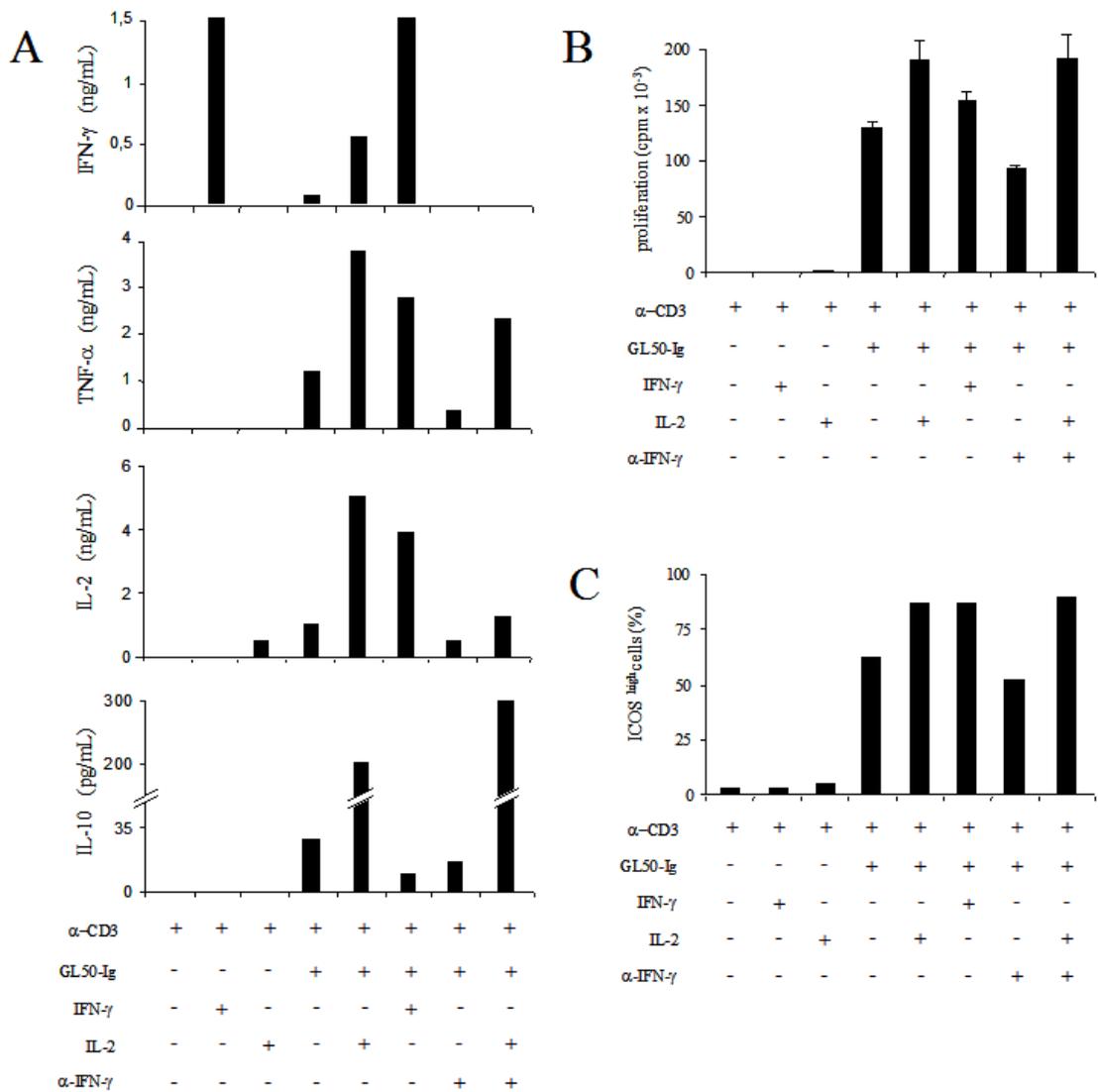


FIGURA 2.4 Effetto del costimolo mediato da ICOS in assenza dello stimolo mediato da CD28. Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/ml) in presenza o assenza di GL50-Ig (5 μ g/ml), anti-IFN- γ (20 μ g/ml), ed IL-2 (2 U/ml). (A) Livelli citochinici (B) saggio di proliferazione ed (C) espressione di ICOS sono stati eseguiti come in Figura 2. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di quattro esperimenti indipendenti. Nel saggio di proliferazione, le barre degli errori indicano la deviazione standard relativa a colture in triplicato. Le citochine sono state dosate sulla miscela dei supernatanti di colture allestite in triplicato.

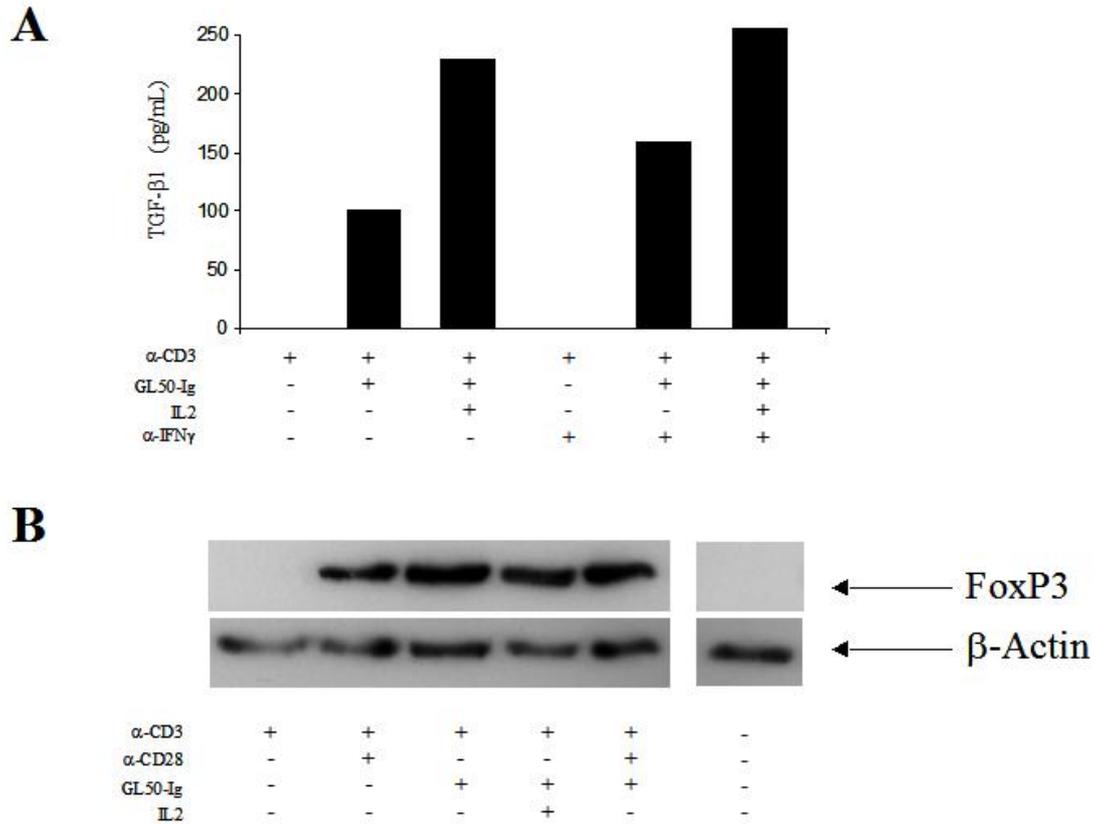


FIGURA 2.5 Effetto del costimolo mediato da ICOS su secrezione di TGF- β 1 ed espressione di FoxP3. (A) Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/ml) in presenza o assenza di GL50-Ig (5 μ g/ml), anti-IFN- γ (20 μ g/ml), ed IL-2 (2 U/ml), e la secrezione di TGF- β 1 e' stata valutata dopo tre giorni di cultura. La citochina e' stata dosata sulla miscela dei supernatanti di colture allestite in triplicato. I risultati mostrati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. (B) Naïve CD4⁺ T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 μ g/ml) in presenza o assenza di GL50-Ig (5 μ g/ml), anti-CD28 (4 μ g/ml), ed IL-2 (2 U/ml), e l'espressione di FoxP3 e' stata valutata dopo tre giorni di cultura tramite Western blotting.

3 Elevati livelli di Osteopontina associati a polimorfismi nel gene, sono un fattore di rischio per lo sviluppo di autoimmunità/linfoproliferazione

3.1 Introduzione

3.1.1 ALPS e DALD

Anomalie ereditarie, in grado di rendere il sistema immunitario incapace di eliminare i linfociti capaci di riconoscere antigeni self, possono causare malattie autoimmuni sia nell'uomo sia nel topo.

Topi *lpr/lpr* e *gld/gld* sono stati la prima dimostrazione di un quadro autoimmune/linfoproliferativo con accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e presenza di autoimmunità [138]. Entrambi i ceppi di topo presentavano inoltre un accumulo di linfociti negativi per gli antigeni di superficie CD4 e CD8 (linfociti DN).

Nell'uomo è stata descritta una condizione simile ai topi *lpr* denominata *Sindrome Autoimmune/Linfoproliferativa* (ALPS) [139-142]. I pazienti, in genere in età pediatrica, presentano una diminuita funzione della cascata di trasduzione del segnale di Fas e manifestazioni autoimmuni severe che coinvolgono principalmente le cellule del sangue (variabili associazioni di anemia, trombocitopenia, neutropenia, ma anche glomerulonefrite e vasculite).

Il quadro clinico che caratterizza l'ALPS include: 1) una linfoproliferazione non neoplastica, con linfadenopatia e/o splenomegalia; 2) una ridotta risposta apoptotica dei linfociti in seguito a trattamento con anticorpi anti-Fas; 3) una percentuale di

linfociti T doppi negativi (DNT) $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^+ \geq 1\%$ nel sangue periferico, o la presenza di cellule DNT nei tessuti linfatici; 4) la presenza di autoimmunità e/o di autoanticorpi e una storia familiare di ALPS.

Il difetto funzionale di Fas è dovuto a mutazioni deleterie a carico del gene di Fas (ALPS-Ia) [143] o di FasL (ALPS-Ib) [144] oppure a mutazioni del gene che codifica per caspasi 10 (ALPS-II) [145]. Queste mutazioni comportano una ridotta funzionalità della caspasi ed interferiscono con la cascata apoptotica. Un ulteriore sottogruppo è rappresentato dai pazienti ALPS III per i quali il difetto apoptotico è dovuto ad mutazioni sconosciute nella cascata di trasduzione del segnale. Recentemente, è stata descritta una mutazione a carico del gene che codifica per caspasi 8, che causa una ridotta apoptosi linfocitaria ed omeostasi ma, diversamente dagli altri pazienti ALPS, è presente anche un difetto di attivazione sia nelle cellule T sia B e NK, cui consegue l'immunodeficienza.

Il nostro gruppo ha identificato pazienti che presentano un quadro clinico simile a quello ALPS, ma privo di linfociti doppi negativi per CD4 e CD8 [146]. Tuttavia essi presentano una diminuita funzionalità di Fas senza presentare mutazioni a carico di Fas o FasL. McKusick ha proposto la denominazione DALD (*Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease*) per questa forma di malattia (OMIM ref#605233). Nella malattia DALD, diversi geni potrebbero essere coinvolti nelle diverse famiglie, e molteplici alterazioni genetiche potrebbero essere richieste per manifestare la malattia. Questo è suggerito dall'osservazione che, spesso, entrambi i genitori dei pazienti sono sani ma Fas resistenti, il che fa pensare alla presenza di una componente ereditaria.

3.1.2 Osteopontina

Osteopontina (OPN) è una fosfoproteina in origine isolata dall'osso murino, umano e bovino (147). Successivamente, è stata rivelata anche in molti altri tessuti e liquidi corporei, tra cui latte, urina, placenta, rene, leucociti, muscolo liscio e cellule tumorali (148). OPN possiede la sequenza tripeptidica "Arginina-Glicina-Aspartato" (RGD), caratteristica delle proteine della matrice extracellulare (ECM) e delle proteine del siero (come fibronectina, vitronectina, collagene e fibrinogeno) (149). Il suddetto dominio permette ad OPN di interagire con vari tipi di cellule attraverso varie integrine (150-151), come $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$. Il legame di OPN alle integrine è responsabile della maggior parte delle funzioni da essa svolte. Un esempio lo si ritrova nell'ambito del processo di riassorbimento dell'osso ove OPN gioca un ruolo attivo legandosi alle $\alpha v\beta 3$ degli osteoclasti (151).

Recentemente è stato proposto che OPN possa avere un ruolo di rilievo nel regolare la differenziazione dei linfociti Th. Per questo motivo OPN è anche chiamata *Eta-1* (*early T lymphocyte activation-1*) e svolge quindi la funzione di citochina per i linfociti T, che la producono nelle prime fasi della loro attivazione (152).

OPN aumenta l'espressione delle citochine Th1 e inibisce quella delle Th2. Nel topo OPN stimola i macrofagi attivati da lipopolisaccaride a produrre IL-12 e inibisce la produzione di IL-10. In linea con questa osservazione, topi "knockout" per OPN rispondono a infezioni normalmente caratterizzate da una risposta di tipo Th1 con una ridotta produzione di IL-12 e una aumentata produzione di IL-10 (153).

Nell'uomo OPN stimola i linfociti T a proliferare e aumenta la produzione di INF- γ e quindi sostiene la risposta immunitaria cellulo-mediata. Tuttavia OPN induce anche l'espressione di CD40L, una delle principali molecole dei linfociti T che modula la

risposta dei linfociti B (che esprimono il CD40) ed è quindi anche coinvolto nella regolazione della risposta anticorpale (154). E' interessante notare che topi transgenici per OPN, sviluppano un quadro di linfoproliferazione e autoimmunità (153). Inoltre aumentati livelli sierici di OPN sono stati associati nell'uomo allo sviluppo di malattie autoimmuni quali LES, artrite reumatoide e sclerosi multipla (155-158).

3.2 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro e' stato la ricerca di fattori coinvolti nello sviluppo della malattia autoimmune DALD.

3.3 Risultati e discussione

Il primo approccio è stato la valutazione del livello di trascrizione di geni coinvolti in apoptosi o proliferazione in linfociti provenienti da un paziente DALD, e dal fratello sano, anch'esso Fas sensibile utilizzando macro-array di DNA.

I linfociti sono stati attivati con PHA ed IL-2 e l'RNA è stato estratto dopo 6 giorni di coltura. Paragonando il profilo d'espressione genica tra i due campioni, abbiamo rilevato che il gene di OPN era fortemente up-regolato nei linfociti del paziente (Fig. 3.1A).

Il passo successivo è stato verificare se tale differenza era rilevabile anche a livello proteico, ed in un numero esteso di soggetti. Sono quindi stati misurati i livelli sierici della citochina in pazienti (Tab. 3.1) e soggetti sani; i pazienti DALD mostravano livelli sierici di OPN più elevati rispetto ai controlli sani (Fig. 3.1B).

Questo dato suggerisce che la citochina può essere coinvolta nello sviluppo di un quadro clinico autoimmune/linfoproliferativo.

È noto da diversi modelli animali, che OPN può alterare i livelli delle immunoglobuline sieriche; abbiamo quindi valutato i livelli di IgG nei due gruppi in esame, e rilevato una correlazione diretta tra i due parametri valutati. Anche i livelli sierici delle IgG sono più elevati nei pazienti DALD che nei soggetti sani (Fig. 3.1C).

In questa prima parte del lavoro, è stata inoltre inserita l'analisi dei livelli sierici di alcune citochine coinvolte nelle risposte Th1 e Th2, allo scopo di escludere la possibilità che l'aumentata espressione di OPN fosse semplicemente una conseguenza di una risposta immunitaria in corso. In particolare IL-2, INF- γ , IL-4, IL-6, IL-10, e TNF- α sono state valutate; soltanto i livelli di IL-10 erano incrementati nei pazienti, ma non abbiamo osservato correlazione con i livelli di OPN.

In base a questi risultati ci siamo proposti di esaminare il gene di OPN. Undici SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) sono stati individuati nel cDNA di OPN. Quattro di questi polimorfismi sono presenti sia nei pazienti sia nei soggetti sani esaminati, e corrispondono alle posizioni +282T>C (esone VI), +750C>T (esone VII), +1083A>G, and +1239A>C (3'UTR; i numeri sono riferiti al codone ATG=+1).

Per questi polimorfismi abbiamo individuato tre aplotipi di più frequente riscontro:

A → 282T-750C-1083A-1239A;

B → 282C-750T-1083A-1239C;

C → 282C-750T-1083G-1239C.

La distribuzione genotipica degli aplotipi è conforme all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Rispetto ai controlli sani, gli aplotipi B e C sono più frequenti nei pazienti, mentre l'aplotipo A è meno rappresentato (Tab. 3.2). Il rischio di sviluppare DALD risulta otto volte superiore in individui con aplotipi B o C rispetto ad individui omozigoti per l'aplotipo A.

Ci siamo chiesti quindi se gli aplotipi B e C fossero associati ad una elevata produzione di OPN. Paragonando i livelli sierici di OPN tra persone sane (comprendenti genitori di pazienti) sani con o senza aplotipo B o C, il livello della citochina era significativamente più elevato nei soggetti con aplotipo B o C rispetto ai soggetti omozigoti AA. Possiamo quindi concludere che la componente genetica può determinare un'elevata espressione di Osteopontina, che a sua volta può predisporre a DALD. Gli alti livelli di Osteopontina prodotti dai pazienti sembrano dunque essere determinati da una componente genetica, soprattutto considerando che i genitori dei pazienti con alto livello della citochina, mostravano tale fenotipo sempre cotrasmeso con gli aplotipi B o C.

Infine sono stati valutati i livelli di mRNA di ogni alotipo; partendo da 7 eterozigoti AC e 6 eterozigoti AB, sono stati sequenziati cloni indipendenti di cDNA, ed è risultato che l'alotipo A è circa 5 volte meno rappresentato degli alotipi C e B (Tab. 3.3). Gli alotipi B e C possono regolare i livelli della proteina sia condizionando trascrizione, maturazione o stabilità dell'mRNA di OPN, sia se in linkage disequilibrium con fattori che controllino la produzione della citochina. L'ipotesi della stabilizzazione dell'mRNA sembra la più plausibile; in quanto gli alotipi B e C presentano variazioni nel 3' UTR, ed è stato dimostrato che polimorfismi nel 3'UTR possono stabilizzare l'mRNA.

In patologie come ALPS o DALD si ha un disequilibrio tra linfoproliferazione e morte cellulare, che possono causare sia autoimmunità sia accumulo di linfociti negli organi linfoidi secondari. Ci siamo quindi chiesti se questa citochina potesse condizionare l'omeostasi linfocitaria. Linfociti di persone sane, sono stati attivati con PHA ed IL-2, in presenza o assenza di OPN ricombinante (rOPN), e dopo 6 giorni di coltura è stata valutata la morte indotta da Fas (trattamento con anti-Fas) o per AICD (*antigen induced cell death*, trattamento con anti-CD3). I linfociti trattati con rOPN sono risultati più resistenti ad AICD dei non trattati, mentre la morte indotta da Fas era equivalente nei due gruppi (Fig. 3.3). L'espansione cellulare è stata valutata tramite conta, a diversi giorni dall'inizio della coltura; rOPN induce un debole ma significativo incremento dell'espansione della popolazione linfocitaria (dato non mostrato).

OPN potrebbe inoltre essere un fattore predisponente che agisce in sinergia con un difetto nella risposta allo stimolo mediato da Fas. È possibile che il difetto nella funzione di Fas e gli elevati livelli di OPN agiscano indipendentemente, abbiamo infatti rilevato che OPN esogena non influenza la morte cellulare indotta da anti-Fas, e che persone sane con una normale risposta a Fas esprimevano elevati livelli di OPN.

La presenza dei due fattori predisponenti non e' sufficiente a indurre malattia. Infatti genitori sani di pazienti DALD possono mostrare entrambi i fattori; sono quindi necessari anche altri fattori, genetici o ambientali, a scatenare la malattia.

In conclusione questo lavoro dimostra per la prima volta la diretta associazione tra variazioni nel gene *OPN*, produzione di OPN e sviluppo di autoimmunita'.

3.4 Figure relative al lavoro

Table 1. Clinical data of DALD patients

Patient no.	Sex	Age, y*	IgG, mg/dL†	OPN, ng/mL†	OPN genotype	ANA	AM	HM	SM	Autoimmunities
1	M	6	966	332	AB	+	+	+	+	AHA, AN, T, RF
2	M	10	1100	254	AA	-	+	-	+	AN, E
3	M	16	506	ND	CC	-	+	-	+	AN, T
4	M	9	1143	286	AC	+	-	-	+	AHA, A
5	F	18	2775	426	AB	+	-	-	+	AN, RF
6	M	16	2810	405	CC	-	+	-	+	T, IH
7	F	24	1259	337	AC	+	-	+	+	AHA, IH
8	F	15	1019	222	AC	+	-	-	+	AHA, T, A1
9	M	16	1132	340	AB	+	-	+	+	AHA, T, IH
10	M	11	679	90	AA	+	+	+	+	AHA, T, V
11	F	11	1542	347	AB	+	+	-	+	AHA,
12	F	17	836	211	AC	+/-	-	-	+	AHA, T, E
13	M	15	1153	298	AC	-	+	-	-	T
14	M	5	900	156	AC	+	+	-	+	T
15	M	10	1117	226	AC	+	+	+	+	AN, T, IH
16	M	33	984	494	BC	ND	+	+	+	AN, T, A1
17	M	6	878	109	CC	+	+	-	-	T
18	F	7	1180	167	AA	+	+	+	+	AHA, AN, T, E, A, C, SR, RF
19	M	10	830	103	AC	+	+	-	+	IDDM, T, A1, AN
20	M	6	ND	37	AC	+	+	-	+	AN, T
21	M	13	ND	383	AC	-	+	-	+	AN
22	F	3	ND	187	AB	+	+	+	+	SR
23	M	17	2110	356	AC	+	+	+	+	AHA, AN, T, RF
24	F	9	842	147	AC	+	-	-	+	T
25	M	2	ND	512	AC	+	+	-	+	AHA, IH, T
26	M	11	ND	365	AB	ND	+	+	+	AN, T

Tabella 3.1 Dati clinici relativi ai pazienti DALD. ANA indica anticorpi antinucleari; AM, adenomegalia; HM, epatomegalia; SM, splenomegalia; +, presence; -, absence; AHA, anemia emolitica autoimmune; AN, neutropenia autoimmune; T, trombocitopenia; RF, febbre ricorrente; E, eczema; ND, indeterminato; A, artrite; IH, epatite immune; Al, alopecia; V, vitiligo; C, morbo celiaco; SR, rash cutaneo; IDDM, diabete mellito insulino-dipendente.

*Eta' al momento dello studio.

†livelli sierici; 95th percentile di controllo OPN levels = 298 ng/mL.

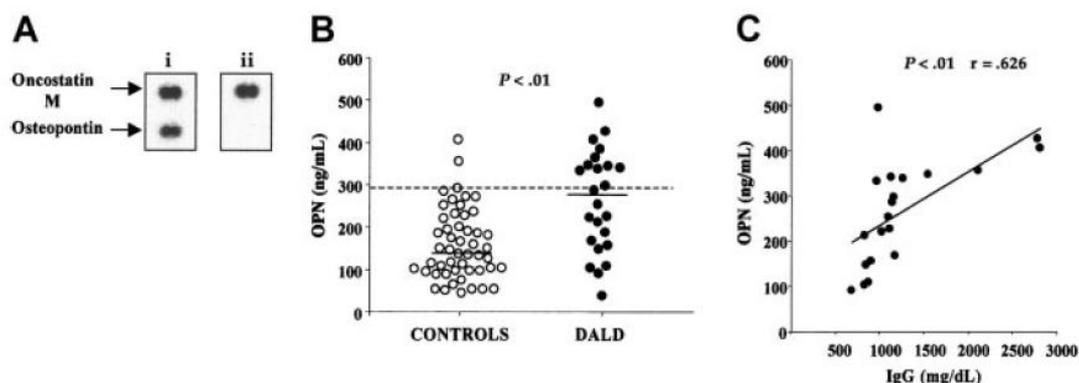


Figura 3.1 Pazienti DALD mostrano aumentati livelli di OPN. (A) Autoradiografia di membrane di macroarray ibridizzate con cDNA proveniente da un paziente DALD (i) e dal suo fratello sano (ii). Sono mostrate *OPN* ed oncostatina come controllo. (B) Concentrazioni sieriche di OPN (ng/mL) in 25 pazienti DALD e 50 soggetti sani. Le linee orizzontali rappresentano i valori delle mediane per ogni gruppo (linea continua) ed il 95° percentile dei controlli (linea tratteggiata). Il valore *P* per le differenze tra pazienti e controlli e' stato calcolato utilizzando il test Mann-Whitney *U*. (C) Correlazione tra livelli sierici di OPN e IgG nei pazienti DALD. La linea rappresenta la migliore regressione lineare. I valori *r* e *P* sono stati valutati utilizzando la correlazione di Pearson. I livelli di OPN sono stati valutati con ELISA.

Table 2. Frequency distribution of OPN haplotypes and genotypes in 26 DALD patients and 158 controls

Haplotype/genotype*	DALD		Controls		Statistic		
	N†	%	N	%	P‡	OR	95% CI
A	25	48	222	70	.0027	0.39	0.21-0.74
B	7	13.5	17	5	.0595	2.74	0.90-7.40
C	20	39.5	77	23	.0491	1.94	0.99-3.73
AA	3	11.5	80	51	.0005	0.13	0.02-0.45
AB	6	23	14	9	NS	—	—
AC	13	50	48	30	NS	—	—
BC	1	4	3	2	NS	—	—
CC	3	11.5	13	8	NS	—	—

Tabella 3.2 Frequenza di distribuzione di aplotipi e genotipi di OPN in 26 pazienti DALD e 158 controlli.

— indica non valutato; ed NS, non significativo.

*Aplotipo A (282T-750C-1083A-1239A), Aplotipo B (282C-750T-1083A-1239C), Aplotipo C (282C-750T-1083G-1239C); Genotipi AA, AB, AC, BC, e CC; non sono stati rilevati soggetti con genotipo BB.

†Numero di cromosomi (per aplotipi) o numero di soggetti (per genotipi).

‡ Valore *P* aplotipo = .0039; Valore *P* genotipo = .0047.

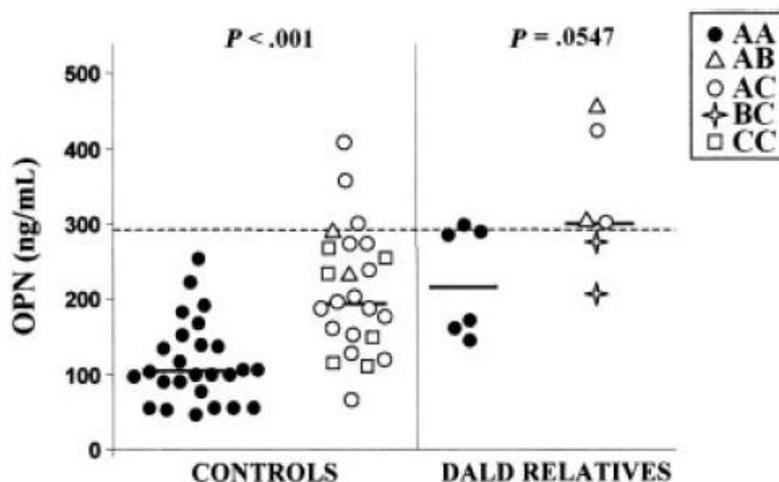


Figura 3.2 Soggetti sani con aplotipo B o C hanno livelli sierici di OPN piu' alti degli omozigoti per l'aplotipo A. Sono stati valutati due gruppi di soggetti (ie, soggetti sani [n = 50] e parenti sani appartenenti alle famiglie mostrate in Fig. 3.3 [n = 12]). I genotipi sono indicati con diversi simboli come indicato in figura. La linea orizzontale continua rappresenta i valori della mediana per ogni gruppo; la linea tratteggiata rappresenta il 95° percentile dei controlli. I valori *P* sono stati calcolati utilizzando il test di Mann-Whitney *U*.

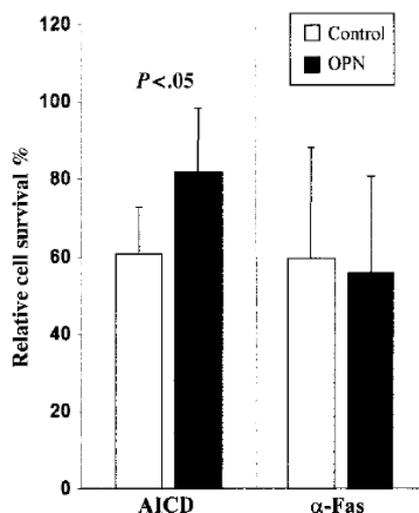


Figura 3.3 OPN inibisce AICD ma non la morte cellulare indotta da Fas. I linfociti sono stati cresciuti in presenza (■) o assenza di rOPN (□). La morte cellulare indotta da Fas e' stata innescata con anti-Fas mAb (CH11) solubile, mentre l'AICD e' stata indotta incubando le cellule in presenza di anti-CD3 mAb (OKT3) in aderenza su piastra. rOPN (500 ng/mL). La sopravvivenza cellulare e' stata valutata dopo 18 ore. I risultati sono espressi come percentuale di sopravvivenza relativa. I risultati sono espressi come medie \pm SD di 5 esperimenti ognuno condotto in duplicato. I valori P sono stati calcolati utilizzando il test di Mann-Whitney *U*. Risultati simili sono stati ottenuti in 2 esperimenti, in cui I linfociti apoptotici sono stati rilevati colorando le cellule con propidio ioduro e annessina V.

Subject	Genotype	Total clones*	Haplotype A clones†		Haplotype B or C clones†	
			n	%	n	%
1	AB	8	0	0	8	100
2	AB	10	1	10	9	90
3	AB	15	3	20	12	80
4	AB	8	3	38	5	63
5	AB	8	1	13	7	88
6	AB	10	1	10	9	90
7	AC	10	2	10	18	90
8	AC	15	3	15	17	85
9	AC	36	4	36	7	64
10	AC	14	1	14	6	86
11	AC	20	2	20	8	80
12	AC	11	1	11	8	89
13	AC	25	2	25	6	75
Total	—	144	24	17	120	83

Tabella 3.3 Livelli di mRNA per ogni aplotipo in 6 AB e 7 AC eterozigoti, valutati sequenziando cloni di cDNA indipendenti. L'analisi statistica e' stata condotta sulle percentuali utilizzando il test Mann-Whitney *U*, e le proporzioni dei cloni con Aplotipo A erano significativamente piu' bassi di quelli con aplotipi B o C ($P < .0001$).

— indica non applicabile.

*Numero di cloni di cDNA di OPN analizzati nel soggetto.

† Numero (n) e percentuale (%) di cloni con aplotipo A e B o C.

4 Aplotipi nel gene di Osteopontina sono correlati a sviluppo e progressione della Sclerosi Multipla

4.1 Introduzione

4.1.1 Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), a decorso cronico e progressivamente invalidante.

Nel 70% dei casi la malattia si presenta e procede in una modalità definita a “ricadute e remissioni” (RR), in cui vi sono recidive imprevedibili durante le quali appaiono nuovi sintomi, e possono peggiorare quelli già presenti. Dopo un periodo variabile dall’esordio, in genere 5-20 anni, nella maggior parte dei casi il decorso diventa progressivo, con o senza ricadute sovrapposte, configurando la forma “progressiva secondaria”(SP). Nel 10% circa dei casi si ha la forma “progressiva primaria”(PP), la malattia è progressiva fin dall’inizio senza attacchi distinti, ma con un esordio lento, ed un costante peggioramento dei sintomi.

Diversi studi suggeriscono si tratti di una patologia multifattoriale che dipende da fattori genetici o ambientali (infezioni virali).

Studi di linkage hanno evidenziato come il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul cromosoma 6 rappresenti un determinante antigenico della SM (159-160).

Oltre alla regione HLA, alcuni studi hanno ipotizzato l'esistenza di altri geni di suscettibilità, tra cui quello per la catena β del TCR sul cromosoma 7 (161), ma per nessuno di questi è stata mostrata una associazione significativa.

Studi di linkage in alcune popolazioni, hanno evidenziato la presenza di polimorfismi di diverse molecole tra cui IL-10, IL-1, l'apolipoproteina E e CTLA-4 (162-165).

Per molti anni l'ipotesi infettiva, in particolare virale, è stata considerata importante nella genesi della SM. Sono stati riportati aumenti del titolo anticorpale sierico e liquorale contro questi microrganismi in pazienti con SM rispetto a controlli sani; e' stata quindi ipotizzata l'associazione infezione/SM [166-167].

Studi immunocistochimici hanno evidenziato che linfociti $CD4^+$ predominano nelle lesioni attive e alla periferia delle aree demielinizzate, mentre linfociti $CD8^+$ hanno una distribuzione prevalentemente perivascolare. I linfociti T $CD4^+$ potrebbero avere un ruolo chiave nella patogenesi della malattia. E' opinione comune che gli eventi iniziali dell'attivazione dei linfociti T avvengano in periferia dove i linfociti T incontrerebbero uno specifico autoantigene presentato da molecole del MHC II espresse da APCs. Queste cellule autoreattive potrebbero essere presenti a livello periferico come linfociti "quiescenti", senza manifestare il proprio potenziale autoaggressivo. Uno stimolo esterno, possibilmente una malattia infettiva, potrebbe attivare questi linfociti. I potenziali meccanismi attraverso i quali eventi del genere potrebbero aver luogo includono: a) la "molecular mimicry", la condivisione di epitopi tra un agente infettivo e molecole del SNC; b) un'attivazione policlonale da superantigene, o di tipo "bystander" da citochine.

Affinché possa iniziare una risposta immunitaria locale a livello del SNC, i linfociti T circolanti attivati in periferia devono attraversare la barriera ematoencefalica. Il processo di diapedesi attraverso questa struttura, implica una complessa interazione tra

a) molecole di adesione, b) chemochine, c) proteasi in grado di alterare la membrana basale, la matrice extracellulare e di degradare la mielina.

Nella fase successiva, i macrofagi e la microglia giocano un ruolo chiave. Questi elementi agiscono come cellule presentanti l'antigene a livello locale, perpetuando la demielinizzazione immunomediata attraverso: a) la fagocitosi, b) il rilascio di citochine, c) l'attivazione di proteasi, d) il rilascio di mediatori tossici.

L'insieme della reazione infiammatoria aggredisce la mielina a livello del SNC, produce demielinizzazione e, successivamente, danno assonale che si suppone essere il correlato patologico del deficit neurologico irreversibile nella SM [168].

4.1.2 Osteopontina e Sclerosi multipla

Recenti lavori hanno proposto che Osteopontina possa avere un ruolo nella patogenesi della Sclerosi Multipla. Tramite l'uso di microarray di oligonucleotidi, e' stato rilevato che il gene codificante OPN e' sovraespresso nelle placche dei pazienti con SM e dei topi con EAE. Inoltre i topi "knockout" per OPN non sviluppano la forma progressiva di EAE e hanno frequenti remissioni; i loro linfociti T autoreattivi contro la mielina producono più IL-10 e meno IFN- γ di quelli "wild type" [158]. E' noto inoltre che pazienti SM con la forma RR, con particolare riguardo alla fase di recidiva, presentano livelli sierici di OPN più elevati rispetto a pazienti con le forme PP ed SP [169-171]. Sono state effettuate analisi del gene su diverse popolazioni, ed e' stata proposta correlazione tra polimorfismi e suscettibilità allo sviluppo della malattia. Nessuno studio ha però correlato i polimorfismi del gene OPN con i livelli sierici della proteina. Nella popolazione italiana quattro polimorfismi formano tre aplotipi, e nel nostro laboratorio ne e' stata dimostrata la correlazione con i livelli sierici della citochina [172].

4.2 Scopo del lavoro

Dati ottenuti nel nostro laboratorio mostrano che pazienti DALD presentano, con elevata frequenza, elevati livelli sierici di OPN. Questa aumentata produzione sembra avere basi ereditarie ed essere in rapporto con particolari aplotipi nel gene di OPN. In particolare quattro polimorfismi di OPN sono presenti sia nei pazienti sia nei soggetti sani, e per questi polimorfismi abbiamo individuato tre aplotipi di più frequente riscontro, A, B e C (in Tab. 4.1 e [172]). Tra persone sane, gli omozigoti per l'aplotipo AA mostrano livelli sierici di OPN significativamente inferiore rispetto a soggetti non-AA. Questi aplotipi sembrano influenzare lo sviluppo dell'autoimmunità, in quanto soggetti non-AA mostrano un rischio otto volte superiore di sviluppare la malattia DALD.

Queste osservazioni ci hanno indotto ad analizzare i tre aplotipi sopra descritti, ed i livelli sierici di OPN nei pazienti con SM, per determinare se fossero coinvolti nello sviluppo e nella progressione della Sclerosi Multipla.

4.3 Risultati e Discussione

In questo studio sono stati considerati 425 pazienti SM e 688 controlli sani, e per ognuno di essi è stata ricostruita la combinazione aplotipica dei quattro polimorfismi. La distribuzione degli aplotipi si è dimostrata essere significativamente differente tra pazienti e controlli. Dall'analisi è risultato che il genotipo AA ha una frequenza più bassa rispetto al non-AA tra pazienti SM, e gli omozigoti AA hanno un rischio 1,56 volte inferiore rispetto agli altri di sviluppare la malattia (dati non mostrati).

Il passo successivo nel lavoro è stato indagare se il genotipo AA potesse influenzare il decorso clinico della malattia; abbiamo quindi considerato progressione e severità della malattia su 288 pazienti.

Come indice di progressione della malattia è stato considerato il passaggio da una forma recidivante-remittente ad una secondaria progressiva, entro od oltre dieci anni dall'esordio della malattia (progressione rapida o lenta); si è osservato che la progressione lenta è significativamente più frequente in pazienti con genotipo AA, rispetto ai non-AA (85% vs 62%, $p < 0.022$) (Tab. 4.4).

Per valutare invece il possibile significato degli aplotipi nel condizionare la severità della patologia, abbiamo considerato come parametro la Scala di Disabilità Estesa (EDSS). Abbiamo confrontato i pazienti che, dopo i dieci anni dall'esordio dalla malattia, hanno un EDSS score ≤ 3.0 (forma benigna di MS), con quelli che invece, nello stesso arco di tempo, sviluppano un EDSS score > 3.0 (forma non benigna di MS). È risultata una maggiore frequenza di pazienti con MS benigna tra quelli con genotipo AA, rispetto a quelli non-AA: 42% vs 20% ($p < 0.003$) (Tab. 4.4). La frequenza di MS benigna su tutti i pazienti considerati nel nostro studio è 29%.

Questi dati ci fanno concludere che pazienti con genotipo AA hanno sintomi piu' lievi della malattia rispetto ai non-AA.

Ci si e' chiesti, a questo punto, se ci fosse correlazione tra malattia, aplotipi del gene e livelli sierici di OPN. Considerando 71 pazienti e 81 controlli sani, i livelli sierici della proteina erano significativamente piu' alti nei pazienti SM, mentre l'espressione delle altre citochine valutate (IL-2, INF- γ , IL-4, IL-6, IL-10, e TNF- α) non era incrementata.

Inoltre, i livelli sierici di OPN sono più alti nei pazienti con genotipo AA rispetto ai controlli con lo stesso genotipo, mentre non abbiamo rilevato differenze tra pazienti e controlli con genotipo non-AA. Come precedentemente riportato, nel gruppo di persone sane, i soggetti con genotipo AA presentano livelli piu' bassi della citochina rispetto ai soggetti con genotipo non-AA; nel gruppo dei pazienti, invece, tra i due genotipi (AA e non-AA) non sono state rilevate differenze (Fig. 4.1).

Nei pazienti, l'elevata espressione di OPN puo' essere dovuta sia dal background genetico sia dall'attivazione del sistema immunitario. Quindi, da una parte i polimorfismi nel 3'UTR (presenti negli aplotipi B e C), potrebbero aumentare la stabilita' del mRNA di OPN, dall'altra l'attivazione del sistema immunitario puo' condizionare i livelli di OPN, e' stato infatti riportato che in pazienti RR, i livelli della citochina, erano piu'elevati nella fase di ricaduta rispetto a quella di remissione. Nel nostro studio, pero', l'analisi dei livelli sierici di citochine interessate nella risposta Th1 o Th2, non ha mostrato differenze tra pazienti e controlli.

Abbiamo quindi, infine, valutato se gli aplotipi potessero influenzare il livello del mRNA. A questo scopo, il cDNA degli aplotipi A, B e C di OPN e' stato trasfettato transientemente in cellule 293T, ed il livello di mRNA e' stato valutato con PCR competitiva. La strategia di clonaggio ha previsto l'aggiunta di una sequenza Myc-

TAG e dell'introne VI al cDNA di partenza, questi per escludere l'amplificazione di mRNA endogeno e del plasmide (Fig. 4.2A). Il livello di mRNA e' stato analizzato prima e dopo 40h di trattamento con Actinomicina D, usata per inibire la trascrizione e valutare la stabilita' del mRNA. In assenza di Actinomicina D, il livello di mRNA di OPN nelle cellule trasfettate con aplotipi B e C, e' risultato piu' alto rispetto a quello delle cellule trasfettate con l'aplotipo A. In presenza di Actinomicina D, il livello di mRNA di OPN nelle cellule trasfettate con l'aplotipo A non e' stato rilevabile, al contrario, alti livelli di amplificato sono stati rilevati nelle trasfezioni con aplotipi B e C (Fig. 4.2B e 4.2C).

Questi dati suggeriscono che gli SNPs negli aplotipi B e C possono stabilizzare l'mRNA di Osteopontina, ed aumentare la produzione di citochina.

Possiamo concludere che il genotipo AA e' protettivo nei confronti dello sviluppo di SM, come si era dimostrato per la patologia DALD. Abbiamo inoltre descritto per la prima volta che genotipi di OPN sono associati a sviluppo severita' e progressione della Sclerosi Multipla. Possiamo infine proporre che questi genotipi siano associati a diversi livelli d'espressione di OPN, che possono influenzare aloro volta lo sviluppo della malattia.

4.4 *Figure relative al lavoro*

Table 1

Schematic representation of the SNP characterizing haplotypes A, B, and C

ATG ^a	282 (T>C)	750 (C>T)	1083 (A>G)	1239 (A>C)
rs ^b	4754	1126616	1126772	9138
Haplotype				
A	T	C	A	A
B	C	T	A	C
C	C	T	G	C

Tabella 4.1 Rappresentazione schematica degli SNP caratterizzanti gli aplotipi A, B, e C.

^a Posizione ATG (ATG=+1) nel cDNA.

^b Numero di accesso nella banca dati NCBI SNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp&cmd=Limits>).

Table 2

Clinical features of MS patients

	Total population, <i>n</i> = 425	Population with follow-up, <i>n</i> = 288
Age, years	41±10 ^a	40±11 ^a
Males/Females	158:267	107:181
Age at onset, years	29±9 ^a	30±9 ^a
Disease duration, years	11±8 ^a	10±9 ^a
EDSS score	3.5±2.5 ^a	3.0±2.5 ^a
RR patients, <i>n</i> (%)	303 (71%)	199 (69%)
SP patients, <i>n</i> (%)	89 (21%)	68 (24%)
PP patients, <i>n</i> (%)	33 (8%)	21 (7%)

Tabella 4.2. Caratteristiche cliniche dei pazienti con SM.

^a Media ±SD

Table 3

Frequency distribution of OPN AA and non-AA genotypes in two independent populations of 425 MS patients and 688 healthy controls

Genotype	Population	
	Controls, <i>N</i> =688	MS ^a , <i>N</i> =425
AA ^b	352 (51)	171 (40)
Non-AA	336 (49)	254 (60)
	OR(CI) ^c =1.56 (1.21–2) <i>p</i> =0.0004885	
AB ^d	59 (9)	48 (11)
AC	214 (31)	165 (39)
BC	14 (2)	15 (4)
CC	48 (7)	22 (5)
BB	1 (0)	4 (1)

Tabella 4.3 Frequenze di distribuzione dei genotipi di OPN AA e non-AA in due popolazioni indipendenti di 425 pazienti SM e 688 controlli sani.

^a Pazienti con Sclerosi Multipla.

^b Numero di soggetti, proporzioni indicate tra parentesi.

^c Odds ratio (OR) e limite di confidenza(CI) 95%. I valori *p* sono stati calcolati usando il test di Yates corrected χ^2 .

^d Distribuzione dettagliata di genotipi non-AA.

Table 4

Frequency distribution of different outcomes in AA and non-AA patients with complete clinical records

Outcome	Genotypes	
	AA	Non-AA
Slow progressors ^a	34 ^b (85)	41 (62)
Fast progressors ^c	6 (15)	25 (38)
	<i>p</i> =0.022 ^d	
Benign MS ^a	30 (42)	21 (20)
Non benign MS ^c	42 (58)	84 (80)
	<i>p</i> =0.003	

Tabella 4.4 Frequenza di distribuzione dei differenti decorsi in pazienti AA e non-AA.

^a Pazienti con forma RR (slow progressors) o EDSS<3 (benign MS) dopo 10 anni dall'esordio.

^b Numero di pazienti con quella forma di malattia; proportions are shown in brackets. Pazienti con forma RR e meno di 10 anni di follow-up (161/288) o forma PP (21/288) sono stati esclusi dall'analisi di progressione. Pazienti con EDSS<3.0 e meno di 10 anni di follow-up (111/288) sono stati esclusi dall'analisi di disabilità.

^c Pazienti passati alla forma SP (fast progressors) o con EDSS>3 (non-benign MS) entro dieci anni dall'esordio.

^d L'analisi statistica è stata condotta comparando i differenti decorsi in pazienti AA e non-AA con il test χ^2 .

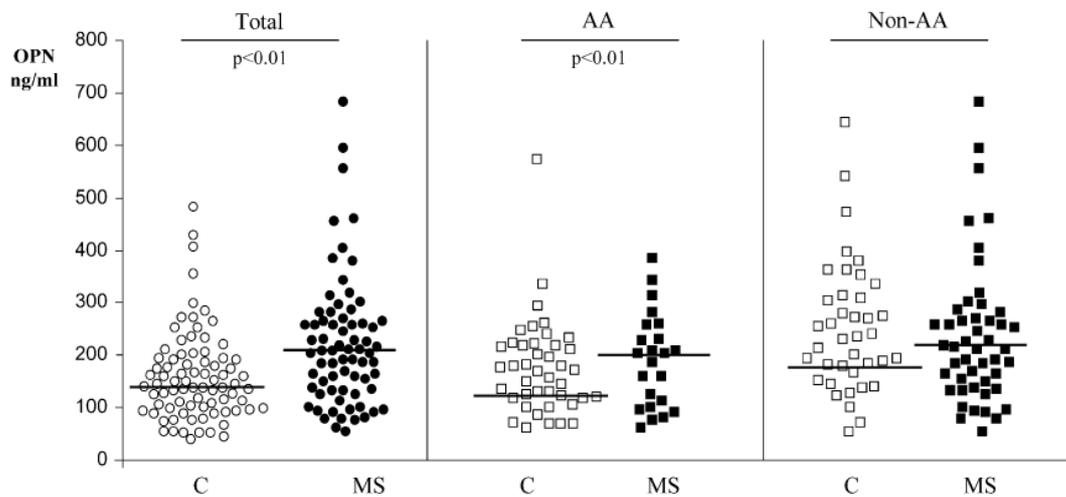


Figura 4.1 Livelli sierici di OPN in pazienti MS e controlli sani con genotipo AA o non-AA. I livelli di OPN sono piu' alti nei pazienti rispetto ai controlli (pannello a sinistra) ed in pazienti AA rispetto a controlli AA (pannello centrale), mentre pazienti e controlli non-AA hanno livelli simili (pannello a destra). Le linee indicano i valori delle mediane per ogni gruppo. Il valore P e' stato calcolato utilizzando il test Mann-Whitney U .

5 Bibliografia

1. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z. et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. 1998. *Annu. Rev. Immunol.* 16:523-544.
2. Janeway CA jr, and Golstein, P. Lymphocyte activation and effector functions. 1993. *Curr. Opin. Immunol.* 5:313-23.
3. Janeway CA jr , and Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte response. 1994. *Cell.* 76:275-85.
4. Hogquist, K. A., T.A. Baldwin, and S. C. Jameson. Central tolerance: learning self-control in the thymus. 2005. *Nature Rev. Immunol.* 5: 772-782.
5. Bousso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S. & Robey, E. Dynamics of thymocyte–stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. 2002. *Science* 296:1876-1880.
6. Palmer, E. Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. 2003. *Nature Rev. Immunol.* 3:383-391.
7. Goodnow CC, Sprent J, de St Groth BF, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. 2005. *Nature.* 435:590-597.
8. Venanzi ES, Benoist C, Mathis D. Good riddance: thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity. 2004. *Curr Opin Immunol.* 16:197-202.
9. Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. 2004. *Immunity.* 20:509-516.
10. Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. 2004. *Nat Rev Immunol.* 4:688-698.
11. Chambers, C. A., and J. P. Allison. Costimulatory regulation of T cell function. 1999. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:203-210.
12. Viola, A. and Lanzavecchia, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. 1996. *Science.* 73:104-106.
13. Peggs Karl S. and James P. Allison. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. 2005. *British Journal of Haematology.*139:809-824.
14. Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, .M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. The immunological synapse. 2001. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375-396.

15. Pizzo, P., A. Viola. Lipid rafts in lymphocyte activation. 2004. *Microbes and Infection*. 6: 686-692.
16. Huppa, J.B., and M.M. Davis. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. 2003. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 973-983.
17. Anton van der Merwe P, Davis SJ, Shaw AS, Dustin ML. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. 2000. *Semin Immunol.* 12(1):5-21.
18. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-26.
19. Prasad, K.V., 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. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2834-2838.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
 28. 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.
 29. Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 coreceptor signalling. 2003. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 544-56.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.

38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. 2004. *Oncogene*. 23:7990-8000.
43. Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. 2002. *Annu Rev Immunol.* 20:371-394.
44. Simeoni L, Kliche S, Lindquist J, Schraven B. Adaptors and linkers in T and B cells. 2004. *Curr Opin Immunol.* 16:304-313.
45. Zamoyska R, Lovatt M. Signalling in T-lymphocyte development: integration of signaling pathways is the key. 2004. *Curr Opin Immunol.* 16:191-196.
46. Horejsi V, Zhang W, Schraven B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. 2004. *Nat Rev Immunol.* 4:603-616.
47. Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. 2005. *Annu Rev Immunol.* 23:549-600.
48. Tybulewicz VL. Vav-family proteins in T-cell signalling. 2005. *Curr Opin Immunol.* 17:267-274.
49. Miletic AV, Swat M, Fujikawa K, Swat W. Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. 2003. *Curr Opin Immunol.* 15:261-268.
50. Arendt CW, Albrecht B, Soos TJ, Littman DR. Protein kinase C-theta: signaling from the center of the T-cell synapse. 2002. *Curr Opin Immunol.* 14:323-330.

51. Tognon CE, Kirk HE, Passmore LA, Whitehead IP, Der CJ, Kay RJ. Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. 1998. *Mol Cell Biol.* 18:6995-7008.
52. Dower NA, et al. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. 2000. *Nat Immunol.* 1:317–321.
53. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. MAP Kinases in the immune response. 2002. *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72.
54. Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. 2003. *Immunol Rev.* 192:7-20.
55. Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. 2005. *J Exp Med.* 202:651-662.
56. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. 2003. *Genes Dev.* 17:2205-2232.
57. Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. 2001. *Nat Immunol.* 2:316-324.
58. Lewis RS. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. 2001. *Annu Rev Immunol.* 19:497–521.
59. Coudronniere N, Villalba M, Englund N, Altman A. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. 2000. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:3394-3399.
60. Sanchez-Lockhart M, et al. Cutting edge: CD28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression are controlled through different signaling pathways. 2004. *J Immunol.* 173:7120-7124.
61. Marinari B, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L. CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. 2004. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:6098-6103.
62. Boise LH, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. 1995. *Immunity.* 3:87-98.
63. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. 1989. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145.

64. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. 1996. *Nature*. 383:787-793.
65. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 100:655-669.
66. Zheng, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89:587-596.
67. Ho, I. C., M. R. Hodge, J. W. Rooney, and L. H. Glimcher. The protooncogene *c-maf* is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. 1996. *Cell*. 85:973-983.
68. Murphy, K.M., S.L. Reiner. The lineage decisions of helper T cells. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 933-944.
69. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. 2002. *Cell*. 109:719-731.
70. Heissmeyer V, et al. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. 2004. *Nat Immunol.* 5:255-265.
71. Ritchie A, Broxmeyer HE. Suppression of p53-mediated growth factor withdrawal-induced apoptosis in the myeloid compartment by hematopoietic cytokines: an overview of hematopoiesis and apoptosis with a presentation of thrombopoietin and the M07E cell line as a model system. 1999. *Crit Rev Oncol Hematol.* 31(3):169-91.
72. Weinberg K, Parkman R. Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. 1990. *N Engl J Med.* 322(24):1718-23.
73. Nagata S. Apoptosis by death factor. 1997. *Cell.* 88: 355-365.
74. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. 1998. *Oncogene.* 24;17(25):3261-70.
75. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. 1992. *Genomics.* 14(3): 821-2.
76. Lenardo M, Chan FK-M, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis- Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. 1999. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 221-53.

77. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. 1995. *Immunology Today* Vol.16 No.12.
78. Nagata S and Golstein P. The Fas death factor. 1995. *Science*. Vol.267.
79. Adachi M, Suematsu S, Kondo T. et al.: Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. 1995. *Nature Genet.* 11:294-300.
80. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE et al.: Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human lymphoproliferative syndrome. 1995. *Cell* 81:935-946.
81. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al.: Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. 1995. *Science*. 268: 1347-1349.
82. Drappa J, Vaishnaw AK, Sullivan KE et al.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. 1996. *N Engl J Med*. 335:1643-1649.
83. Bettinardi A, Brugnani D, Quiros-Roldan E et al.: LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. 1997. *Blood*. 89:902-909.
84. E. Hauben, Roncarolo M. G. Human CD4+ regulatory T cells and activation-induced tolerance. 2005. *Microbes and Infection*. 7: 1023-1032.
85. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. 2003. *Science*. 299:1057-61.
86. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. 2003. *Nat. Immunol.* 4:330-36.
87. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. 2005. *Immunity*. 22:329-41.
88. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. 2001. *Nat. Genet.* 27:68-73.
89. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova J-L, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. 2001. *Nat. Genet.* 27:18-20.

90. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PF, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutation of FOXP3. 2001. *Nat. Genet.* 27:20-21.
91. Ziegler S. F. FOXP3: Of Mice and Men. 2006. *Annu. Rev. Immunol.* 24:7.1-7.18
92. Walker M.R., Kaspirowicz D.J., Gersuk V.H., Benard A., Van Landeghen M., et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. 2003. *J. Clin. Invest.* 112:1437-43.
93. Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonissoni S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. 1996. *Eur J Immunol.* 26: 2781-89.
94. Buonfiglio,D, Bragardo M, Bonissoni 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. 1999. *Eu J Immunol.* 29:2863-74.
95. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell costimulatory or structurally and functionally related to CD28. 1999. *Nature.* 397:263-66.
96. Donatella Buonfiglio, Manuela Bragardo, Valter Redoglia, Rosanna Vaschetto, Flavia Bottarel, Sara Bonissoni, 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. 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 3463-3467.
97. Parry RV, Rumbley CA, Vandenberghe LH, June CH, Riley JL. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. 2003. *J.Immunol.* 171:166-74.
98. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . 1999. *Immunity.* 11:423-32.
99. Okamoto N, Tezuka K, Kato M, Abe R, Tsuji T. PI3-kinase and MAPkinase signaling cascades in AILIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have

- distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:691-702.
100. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, et al. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. 2000. *J. Immunol.* 164:1653-57.
101. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. 1999. *Nature.* 402:827-32.
102. Brodie D, Collins AV, Iaboni A, Fennelly JA, Sparks LM, et al. LICOS, a primordial costimulatory ligand? 2000. *Curr. Biol.* 10:333-36.
103. Wang SD, Zhu GF, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, et al. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. 2000. *Blood.* 96:2808-13.
104. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. 2000. *J. Immunol.* 164:4689-96.
105. Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, et al. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. 2004. *Gastroenterology.* 126:1347-57.
106. Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, T. Burwell, H. Schneider, J. A. Gonzalo, M. Gosselin, L. R. Owen, C. E. Rudd, and J. C. Gutierrez-Ramos. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell dependent immune responses. 2000. *Immunity.* 13:95-105.
107. McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. 2001. *Nature* 409:102-105.
108. Tafuri, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L. M. Boucher, D. Bouchard, V. S. Chan, G. Duncan, B. Odermatt, A. Ho, A. Itie, T. Horan, J. S. Whoriskey, T. Pawson, J. M. Penninger, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. 2001. *Nature* 409:105-109.
109. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. 2003. *Nat. Immunol.* 4:261-68.
110. McAdam, A. J., T. T. Chang, A. E. Lumelsky, E. A. Greenfield, V. A. Boussiotis, J. S. Duke-Cohan, T. Chernova, N. Malenkovich, C. Jabs, V. K.

- Kuchroo, V. Ling, M. Collins, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. 2000. *J. Immunol.* 165: 5035-5040.
111. Feito, M. J., R. Vaschetto, G. Criado, A. Sanchez, A. Chiochetti, A. Jimenez-Perianez, U. Dianzani, P. Portoles, and J. M. Rojo. Mechanisms of ICOS costimulation: effects on proximal TCR signals and MAP kinase pathway. 2003. *Eur. J. Immunol.* 33:204-214.
112. Gonzalo, J. A., J. Tian, T. Delaney, J. Corcoran, J. B. Rottman, J. Lora, A. Algarawi, R. Kroczeck, J. C. Gutierrez-Ramos, and A. J. Coyle. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. 2001. *Nat. Immunol.* 7:597-504.
113. Dong, C., A. E. Juedes, U. A. Temann, S. Shresta, J. P. Allison, N. H. Ruddle, and R. A. Flavell. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T cell activation and function. 2001. *Nature.* 409:97-101.
114. Rottman, J. B., T. Smith, J. R. Tonra, K. Ganley, T. Bloom, R. Silva, B. Pierce, J. C. Gutierrez-Ramos, E. Ozkaynak, and A. J. Coyle. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. 2001. *Nature Immunol.* 2:605-611.
115. Kopf, M., A. J. Coyle, N. Schmitz, M. Barner, A. Oxenius, A. Gallimore, J. C. Gutierrez-Ramos, and M. F. Bachmann. Inducible Costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. 2000. *J. Exp. Med.* 192:53-61.
116. Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. 2002. *Nature Med.* 8:1024-1032.
117. Guo, J., M. Stolina, J. V. Bready, S. Yin, T. Horan, S. K. Yoshinaga, and G. Senaldi. Stimulatory effects of B7-related protein-1 on cellular and humoral immune responses in mice. 2001. *J. Immunol.* 166:5578-5584.
118. Nurieva, R. I. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. 2005. *Clin. Immunol.* 115:19-25.
119. Ozkaynak, E., W. Gao, N. Shemmeri, C. Wang, J. C. Gutierrez-Ramos, J. Amaral, S. Qin, J. B. Rottman, A. J. Coyle, and W. W. Hancock. Importance of

- ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. 2001. *Nat. Immunol.* 2:591-596.
120. Harada, H., A. D. Salama, M. Sho, A. Izawa, S. E. Sandner, T. Ito, H. Akiba, H. Yagita, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and M. H. Sayegh. The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. 2003. *J. Clin. Invest.* 112:234-243.
121. Yagi, J., Y. Arimura, U. Dianzani, T. Uede, T. Okamoto, and T. Uchiyama. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4⁺ T cells during Th cell development. 2003. *J. Immunol.* 171:783-794.
122. Nurieva, R. I., J. Duong, H. Kishikawa, U. Dianzani, J. M. Rojo, I. C. Ho, R. A. Flavell, and C. Dong. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. 2003. *Immunity* 18:801-873.
123. Kohyama, M., D. Sugahara, S. Sugiyama, H. Yagita, K. Okumura, and N. Hozumi. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101:4192-4197.
124. Wassink, L., P. L. Vieira, H. H. Smits, G. A. Kingsbury, A. J. Coyle, M. L. Kapsenberg, and E. A. Wierenga. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. 2004. *J. Immunol.* 173:1779-1786.
125. Vieira, P. L., L. Wassink, L. M. Smith, S. Nam, G. A. Kingsbury, J. C. Gutierrez-Ramos, A. J. Coyle, M. L. Kapsenberg, and E. A. Wierenga. ICOS-mediated signaling regulates cytokine production by human T cells and provides a unique signal to selectively control the clonal expansion of Th2 helper cells. 2004. *Eur. J. Immunol.* 34:1282-1290.
126. Zuberek, K., V. Ling, P. Wu, H. L. Ma, J. P. Leonard, M. Collins, and K. Dunussi-Joannopoulos. Comparable in vivo efficacy of CD28/B7, ICOS/GL50, and ICOS/GL50B costimulatory pathways in murine tumor models: IFN γ -dependent enhancement of CTL priming, effector functions, and tumor specific memory CTL. 2003. *Cellular Immunology* 225:53-63.

127. Liu, X., X. F. Bai, J. Wen, J. X. Gao, J. Liu, P. Lu, Y. Wang, P. Zheng, and Y. Liu. B7H Costimulates Clonal Expansion of, and Cognate Destruction of Tumor Cells by CD8⁺ T Lymphocytes In Vivo. 2001. *J. Exp. Med.* 194:1339-1348.
128. Wallin, J. J., L. Liang, A. Bakardjiev, and W. C. Sha. Enhancement of CD8⁺ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. 2001. *J. Immunol.* 167:132-139.
129. Ara, G., A. Baher, N. Storm, T. Horan, C. Baikalov, E. Brisan, R. Camacho, A. Moore, H. Goldman, T. Kohno, R. C. Cattley, G. Van, K. Gaida, M. Zhang, J. S. Whoriskey, D. Fong, and S. K. Yoshinaga. Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts. 2003. *Int. J. Cancer.* 103:501-507.
130. Levings, M. K., R. Bacchetta, U. Schulz, M. G. Roncarolo. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. 2002. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129:263-276.
131. Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. 2005. *Nat. Rev. Immunol.* 5:271-283.
132. Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich, and K. Blaser. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. 1998. *J. Clin. Invest.* 102:98-106.
133. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. 2001. *Nature Immunol.* 2:725-731.
134. Boussiotis, V. A., E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes, and A. E. Goldfeld. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. 2000. *J. Clin. Invest.* 105:1317-1325.
135. Gerosa, F., C. Nisii, S. Righetti, R. Micciolo, M. Marchesini, A. Cazzadori, and G. Trinchieri. CD4(+) T cell clones producing both interferon- γ and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. 1999. *Clin. Immunol.* 92:224-234.
136. Trinchieri, G. Regulatory role of T cells producing both interferon- γ and interleukin-10 in persistent infection. 2001. *J. Exp. Med.* 194:53-57.
137. Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel A., Moretta, L. and Moretta, A. The small subset of CD56 bright CD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- γ

- production upon interaction with dendritic cells. 2004. *Eur. J. Immunol.* 34: 1715-1722.
138. Adachi M, Suematsu S, Kondo T. et al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. 1995. *Nature Genet.* 11, 294-300.
139. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human lymphoproliferative syndrome. 1995. *Cell* 81, 935-946.
140. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. 1995. *Science* 268: 1347-1349.
141. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE et al. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. 1996. *N Engl J Med* 335, 1643-1649.
142. Bettinardi A, Brugnani D, Quiros-Roldan E et al. LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. 1997. *Blood* 89, 902-909.
143. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. 1999. *Curr Opin Pediatr.* 11(6):521-7.
144. Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. 1999. *Clin Immunol.* 93(1):34-45.
145. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. 1999. *Cell.* 98(1):47-58.
146. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, Redoglia V, Bonisconi S, Corra A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. 1997. *Blood* 89: 2871-2879.
147. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. 1998. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:92-102.

148. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. 1989. *Connect. Tissue Res.* 23 (2-3): 123-36.
149. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. 1987. *Science.* 238(4826):491-7.
150. Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. 2001. *J Biol Chem.* 276(16):13483-9.
151. Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM. A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. 2000. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(3):764-9.
152. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. 2000. *Immunol Today.* 21(10):475-8.
153. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. 1999. *Exp Nephrol.* 7(2):103-13.
154. O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. 2000. *J Leukoc Biol.* 68(4):495-502.
155. Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. 1998. *Lab Invest.* 78(12):1523-33.
156. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, Fukuda K, Kanai H, Nakashima H, Otsuka T, Hirakata H. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. 2001. *Arthritis Rheum.* 44(9):2097-106.
157. Sakata M, Tsuruha JI, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Matsui T, Sudo A, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. 2001. *J Rheumatol.* 28(7):1492-5.
158. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuz M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 294(5547):1731-5, 2001.

159. [Bell JL, Lathrop GM.](#): Multiple loci for multiple sclerosis. 1996. *Nat Genet.* 13(4): 377-8.
160. [Ebers GC, Dyment DA.](#): Genetics of multiple sclerosis. 1998. *Semin Neurol.* 18(3): 295-9.
161. Seboun E, Robinson MA, Doolittle TH, Ciulla TA, Kindt TJ, Hauser SL.: A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. 1989. *Cell.* 57(7):1095-100.
162. Almeras L, Meresse B, Seze JD, Lefranc D, Dubucquoi S, Fajardy I, Vermersch P, Prin L.: Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. 2002. *Eur Cytokine Netw.* 13(2):200-6.
163. [Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K.](#): Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. 2001. *J Neuroimmunol.* 118(2): 295-9.
164. Schmidt S, Barcellos LF, DeSombre K, Rimmner JB, Lincoln RR, Bucher P. Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis. 2002. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 708-717.
165. Rasmussen HB, Kelly MA, Francis DA, Clausen J. CTLA4 in multiple sclerosis. Lack of genetic association in a European Caucasian population but evidence of interaction with HLA-DR2 among Shanghai Chinese. 2001. *J Neurol Sci.* 184(2):143-7.
166. Henson TE, Brody JA, Sever JL, Dyken ML, and Cannon J. Measles antibody titers in multiple sclerosis patients, siblings, and controls. 1970. *JAMA* 211: 1985-9.
167. Alperovitch A, Berr C, Cambon-Thomsen A, Puel J, Dugoujon JM, Ruidavets JB, and Clanet M. Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. 1991. *Hum. Immunol.* 31:94-9.
168. Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. 2002. *Clin Neurol Neurosurg.* 104(3):168-71.
169. Vogt, M.H., Lopatinskaya, L., Smits, M., Polman, C.H., Nagelkerken, L., et al., Elevated osteopontin levels in active relapsing–remitting multiple sclerosis. 2003. *Ann. Neurol.* 53:819-822.

170. Vogt, M.H., Floris, S., Killestein, J., Knol, D.L., Smits, M., Barkhof, F., Polman, C.H., Nagelkerken, L. Osteopontin levels and increased disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. 2004. *J. Neuroimmunol.* 155: 155-160.
171. Comabella, M., Pericot, I., Goertsches, R., Nos, C., Castillo, M., Blas Navarro, J., et al., Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. 2005. *J. Neuroimmunol.* 158:231-239.
172. Chiochetti A., M. Indelicato, T. Bensi, R. Mesturini, M. Giordano, S. Sametti, L. Castelli, F. Bottarel, M.C. Mazzarino, L. Garbarini, F. Giacomelli, G. Valesini, C. Santoro, I. Dianzani, U. Ramenghi, and U. Dianzani. High levels of Osteopontin associated to polymorphism in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. 2004. *Blood.* 103:1376-82.

6 *Pubblicazioni ottenute*

- Comi C, Gaviani P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, **Mesturini R**, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Cantello R, Monaco F, Dianzani U. Fas-mediated T-cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2006 Mar;11(1):53-60.
- Azzimonti B, Mondini M, De Andrea M, Gioia D, Dianzani U, **Mesturini R**, Leigh G, Tiberio R, Landolfo S, Gariglio M. CD8⁺ T-cell lymphocytopenia and lack of EVER mutations in a patient with clinically and virologically typical virologically typical epidermodysplasia verruciformis. *Arch Dermatol.* 2005 Oct; 141(10):1323-5.
- Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, **Mesturini R**, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol.* 2005 163:172-8
- 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.
- Chiocchetti A., M. Indelicato, T. Bensi, **R. Mesturini**, M. Giordano, S. Sametti, L. Castelli, F. Bottarel, M.C. Mazzarino, L. Garbarini, F. Giacopelli, G. Valesini, C. Santoro, I. Dianzani, U. Ramenghi, and U. Dianzani. High levels of Osteopontin associated to polymorphism in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004; 103:1376-82.
- Dianzani U., Bensi T., Savarino A., Sametti S., Indelicato M., **Mesturini R.** and Chiocchetti A. Role of Fas in HIV infection. *Current HIV Research* 2003; 1: 405-417.
- Savarino A., Bensi T., Chiocchetti A., Bottarel F., **Mesturini R.**, Ferrero E., Calosso L., Deaglio S., Ortolan E., Buttò F., Cafaro A., Katada T., Ensoli B., Malavasi F. and 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.