



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
IMMUNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE APPLICATE

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO
XXI

Titolo della tesi

*Ruolo delle cellule T regolatorie in vitro e in vivo in un modello di colite
autoimmune.*

Cecilia Palombi

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. Gino Doria/ Dott.ssa Luigia Pace

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

INDICE

Introduzione.....	
Tolleranza Immunologica	pag 1
Natural arising regulatory T Cells	pag 2
Foxp3 controlla lo sviluppo e la funzione delle Treg	pag 3
Come fa Foxp3 a orchestrare i programmi cellulari e molecolari coinvolti nel funzionamento delle Treg?	pag 4
Il repertorio antigenico riconosciuto dalle Treg	pag 5
Interleukina 2 e cellule Foxp3 ⁺ Treg	pag 6
Generazione di cellule Treg periferiche da cellule naive	pag 7
Localizzazione delle cellule Treg	pag 8
Attivazione, proliferazione e differenziamento delle Treg.	pag 9
In quale modo avviene la soppressione Treg mediata?	pag 10
IL-4	pag 11
Trasduzione del segnale del recettore per IL-4	pag 12
Cellule Treg e IL-4	pag 13
IFN γ .	pag 14
IL-17	pag 14
IMMUNO BOWEL DISEASE	pag 16
Scopo della tesi.....	pag 20
Materiali e metodi.....	
Topi	pag 22
Anticorpi e reagenti	pag 22
Purificazioni cellulari	pag 23
Sorting cellulare	pag 23
Saggio di proliferazione	pag 24
Titolazione delle citochine	pag 24
Analisi citofluorimetrica	pag 25

Western blot (WB)	pag 25
Istologia	pag 26
Analisi statistica	pag 26
Risultati.....	
Le cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg sopprimono l'attivazione e la proliferazione delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th	pag 27
CD25 gioca un ruolo fondamentale nella soppressione mediata dalle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T regolatorie	pag 27
IL-4 promuove la proliferazione delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th e delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	pag 29
IL-4 protegge le cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th dalla soppressione mediata dalle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg.	pag 29
Analisi dell'espressione di IL-4R α sulle popolazioni cellulari	pag 31
Espressione di IL-4Ra in topi IL-4R α ^{+/+} e in topi IL-4R α ^{-/-}	pag 31
L'espressione della catena IL-4R α protegge le cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th dalla soppressione	pag 32
Espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2 in cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th	pag 34
Le CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg inibiscono la produzione di IL-2 da parte delle CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th in presenza di IL-4	pag 35
Le cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD45RB ^{LOW} treg inibiscono lo sviluppo della colite autoimmune	pag 35

Topi SCID inoculati con cellule CD4⁺CD25⁺CD45RB^{high} IL-4R α ^{-/-} mostrano sintomi della colite più accentuati rispetto ai topi inoculati con cellule CD4⁺CD25⁺CD45RB^{high} IL-4R α ^{+/+}. pag 37

Analisi del decorso della colite ulcerosa con base autoimmune in topi SCID inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{HIGH} IL-4R α ^{+/+} o con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{HIGH} IL-4R α ^{-/-} pag 38

Analisi della proliferazione e della produzione di IL-2 in cellule isolate da linfonodi mesenterici, dalla lamina propria e dalla milzadi topi SCID inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{+/+} o con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{-/-} pag 39

Analisi della produzione di IFN γ in cellule isolate da linfonodi mesenterici, e dalla lamina propria di topi SCID inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{+/+} o con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{-/-} pag 40

Discussione.....pag 61

Bibliografia.....pag 65

INTRODUZIONE

Il sistema immunitario dei mammiferi protegge l'ospite da un ampio spettro di microrganismi evitando, tuttavia, risposte immunitarie aberranti ed eccessive. Le risposte immunitarie, sia protettive che dannose, sono principalmente mediate dalle cellule T e B, le quali possiedono enorme diversità nel riconoscimento degli antigeni, elevata specificità antigenica, potente attività effettrice ed una duratura memoria immunologica. In virtù di queste potenzialità, reazioni aberranti del sistema immunitario, come autoimmunità e allergie, possono causare seri danni nell'ospite.

Uno dei maggiori obiettivi dell'Immunologia e della Medicina è di capire come sia stabilito e mantenuto lo stato di non reattività agli antigeni *self* (Tolleranza immunologica).

TOLLERANZA IMMUNOLOGICA.

Ci sono due tipi meccanismi, "recessivo" e "dominante" per il mantenimento della tolleranza al *self* e della omeostasi immunologica.

Nel meccanismo di tipo recessivo, il destino dei linfociti autoreattivi è determinato in modo intrinseco alla cellula stessa. Alcuni linfociti, ad esempio, sono programmati a morire per apoptosi quando esposti a *self*-antigeni nel corso del loro sviluppo in organi generativi centrali (il timo per i linfociti T e il midollo osseo per i linfociti B). Altri linfociti T e B possono sostituire recettori self-reattivi (TCR e BCR rispettivamente), con altri non reattivi. Questo meccanismo è chiamato

editing. Le cellule che riescono a sfuggire alla delezione clonale e all'*editing* possono diventare anergiche dopo l'incontro con il *self*-antigene, in più in seguito ad attivazione esprimono recettori inibitori, oppure molecole coinvolte in *signaling* di morte cellulare.

Nel meccanismo di tipo recessivo alcuni sottotipi di cellule T controllano l'espansione di linfociti aberranti o esageratamente reattivi.

Da qualche anno ormai è stato scoperto che il normale sistema immunitario produce una popolazione di cellule T, chiamate cellule T regolatorie (Treg). Danni nello sviluppo o nella funzione delle Treg sono la causa principale di malattie autoimmuni ed infiammatorie sia nell'uomo che negli animali. Ogni risposta immunitaria adattativa coinvolge non solo i linfociti T e B ma anche le a Treg, e l'equilibrio fra le due popolazioni è cruciale per controllare la qualità e la potenza della risposta e per stabilire la tolleranza ai *self*-antigeni.

NATURAL ARISING REGULATORY T CELLS

Timectomie neonatali di topi di circa tre giorni risultano in danni autoimmuni in vari organi (come ad esempio tiroide, ovaie, testicoli e intestino) e compaiono autanticorpi tessuto-specifici in circolazione. Timectomie in ratti adulti seguite da cicli di radiazioni producono tiroiditi autoimmuni, e diabete di tipo I. L'inoculo di linfociti T CD4⁺ o timociti CD4⁺CD8⁻ da animali singenici non trattati inibisce lo sviluppo di autoimmunità. Questi risultati indicavano che animali normali producevano non solo cellule T *self*-reattive ma anche cellule T in grado di sopprimere l'autoimmunità. Cellule CD4⁺ totali purificate da milza di topi o ratti normali deplete della popolazione CD45Rb^{low} trasferite in topi singenici atimici provocavano in questi ultimi spontanei disordini autoimmunitari, ricostituendo i topi con la sottopopolazione CD45Rb^{low} l'autoimmunità era inibita (1; 2) (Fig 1 A). Successivamente furono delineati ulteriori marker identificativi di queste cellule come il CD25 (catena α del recettore per IL-2) (3). La deplezione delle Treg produce anche una colite di tipo autoimmune (Immuno Bowel disease), dovuta ad

una eccessiva risposta ai batteri commensali dell'intestino (4). La rimozione o la riduzione delle cellule $CD25^+CD4^+$ Treg provoca un aumento della risposta effettrice sia nei tumori che nelle infezioni portando a diminuire la massa tumorale e a debellare i microbi. Al contrario un arricchimento di queste cellule porta alla soppressione delle allergie, alla stabilizzazione della tolleranza a trapianti di organo, alla prevenzione del *graft-versus-host* nel trapianto di midollo osseo e alla promozione della tolleranza madre-feto.

Alla luce di queste evidenze si può asserire che il sistema immunitario genera cellule $CD4^+CD25^+Cd45Rb^{low}$ tregs le quali vengono ingaggiate in risposte verso il *self*, *quasi-self* (come antigeni tumorali), e *non-self* (come microbi, trapianti), queste cellule sono generate nel timo ma persistono in periferia dove esercitano un controllo costante su linfociti T autoreattivi. Una diminuzione di Treg in periferia genera disordini autoimmunitari e immunopatologie.

Foxp3 controlla lo sviluppo e la funzione delle Treg. Le cellule Treg provenienti dal timo esprimono specificatamente Foxp3 (*forkhead box P3*), un fattore di trascrizione membro della famiglia dei fattori a forcina che legano la doppia elica del DNA. Foxp3 è il maggior regolatore dello sviluppo e della funzione delle Treg. Il gene *foxp3* è il primo gene difettivo identificato nel ceppo murino *Scurfy*. *Scurfy* è un mutante recessivo *X-linked* che è letale per i maschi emizigoti a circa un mese dalla nascita poiché sviluppano una attivazione eccessiva delle cellule T $CD4^+$ ed una sovrapproduzione di citochine proinfiammatorie (5). Mutazioni del gene per Foxp3 sono la causa genetica di malattie come l'IPEX (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom*), che è la controparte umana di *Scurfy*. Il quadro clinico e immunologico dei pazienti IPEX è simile a quello sviluppato dai topi con Treg deplete ciò ha fatto pensare che Foxp3 sia fondamentale per la generazione, lo sviluppo e la funzione delle Treg (6).

Vari studi hanno rilevato che cellule T e timociti $CD4^+CD8^-CD25^+$ esprimono Foxp3, mentre altre popolazioni di cellule T o timociti sia attivate che *resting* non lo esprimono. Transduzioni retrovirali del gene *foxp3* converte le cellule T $CD4^+CD25^-$ in cellule $CD4^+CD25^+$ che sono in grado di sopprimere *in vitro* la

proliferazione delle altre cellule T e di inibire lo sviluppo di patologie autoimmuni *in vivo* (7) La transduzione del gene *foxp3*, inoltre, upregola l'espressione di CD25 e di altre molecole associate alla superficie delle treg come CTLA-4 (Cytotoxic T cell associated antigen-4) e GITR (Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein), mentre reprime la produzione di IL-2, IFN γ , e IL-4. Sia nei topi *knock out* (ko) per *foxp3* sia nei topi *Scurfy*, nei quali manca il dominio di legame al DNA del fattore Foxp3 inoculi di cellule T CD4⁺CD25⁺ da topi normali prevengono la severa infiammazione sistemica (6). In topi chimera il cui midollo osseo è costituito da cellule provenienti da topi *wild type* (wt) e da topi *foxp3* ko, le cellule wt sono in grado di generare Treg mature che sopprimono lo sviluppo di disordini autoimmunitari le ko falliscono nella generazione di cellule Treg. Al contrario in topi che sovraesprimono Foxp3 il numero di cellule CD4⁺CD25⁺ è maggiore (8).

Così possiamo concludere che il fattore di trascrizione Foxp3 è importante per far sì che cellule positive per α/β TCR differenzino in cellule T CD4⁺CD25⁺ T regolatorie, che alti livelli di espressione di *foxp3* conferisce attività soppressoria anche a cellule non-Treg, mutazioni nel gene *foxp3* portano a disordini autoimmunitari sia nel topo che nell'uomo ed infine che Foxp3 è fondamentale per la generazione, lo sviluppo e la funzione delle Treg.

Come fa Foxp3 a orchestrare i programmi cellulari e molecolari coinvolti nel funzionamento delle Treg? E' stato mostrato che Foxp3 interagisce con il fattore di trascrizione NFAT (*Nuclear Factor of Activate T cells*), AML1 (*Acute Myeloid Leukemia 1*), Runx1 (*Run-relatedtranscription factor1*), il complesso HAT/HDAC (istone acetil trasferasi/istone deacetil trasferasi) e NF-kB. L'attività di NFAT è controllata dal calcio e dalle calcineurine fosfatasi calcio-dipendenti. Dopo attivazione NFAT un complesso con AP-1 e NF-kB, che promuove l'espressione di *Il-2*, *Il-4*, *Ctla-4* e altri geni coinvolti nell'attivazione dei linfociti T e nel differenziamento dei linfociti effettori. Uno studio recente ha dimostrato che Foxp3 lega NFAT nel momento in cui entrambi legano il DNA (9). Sostituzioni aminoacidiche nel dominio a forcina di Foxp3 impedisce la formazione del complesso Foxp3-NFAT e vengono meno le funzioni di Foxp3 come reprimere *Il-*

2, attivare *Ctla-4* e *Cd25*, conferire capacità di sopprimere alle cellule T. Topi ko per NFAT sviluppano spontaneamente linfadenopatie, attivazione selettiva di cellule Th2 accompagnata da iperproduzione di IgE, suggerendo che la mancanza di NFAT inficia sulla funzione di Foxp3 e di conseguenza delle Treg. Il complesso AML1/Runx1 è cruciale per la normale ematopoiesi e per lo sviluppo di cellule T nel timo. A differenza di NFAT che è defosforilato da calcineurine e traslocato nel nucleo dopo attivazione delle cellule T, AML1/Runx1 lega costitutivamente il promotore *Il-2* a monte del sito di legame di NFAT, AP-1 NF-kB. Dopo attivazione AML1/Runx1 facilitano il legame di NFAT al promotore di *Il-2*. Nelle Treg, invece, il complesso AML1/Runx si lega a Foxp3 nella regione N-terminale tra il dominio a zipper di leucine e il box a forcina. Topi ko per AML1/Runx1 mostrano disordini autoimmuni simili a quelli che si sviluppano in seguito a deplezione delle Treg. Nel *signaling* di Foxp3 sono coinvolti anche HAT e HDAC. Quando Foxp3 viene acetilato da HAT aumenta il suo legame al promotore di *Il-2* e aumenta la repressione di questo gene (10). Studi recenti hanno mostrato che Foxp3 controlla circa 700 geni, di questi il 10% li lega direttamente (11). I geni controllati da Foxp3 codificano per molecole coinvolte in diversi *pathways* di *signaling* (come *Zap70* e *Ptpn22*), fattori di trascrizione (come *Crem*), citochine (come *Il-2*), e molecole di superficie (come *Il-2ra*, *Ctla-4*, e *Fas-l*). Tutto ciò suggerisce che Foxp3 attivi una serie di geni che portano al differenziamento di cellule T in Treg. A supportare questo modello l'osservazione che topi esprimenti quantità di Foxp3 inferiore al normale le Treg non solo perdono la loro capacità soppressoria ma spontaneamente differenziano in linfociti T effettori che producono IL-2, IFN γ , e IL-4 (12). Foxp3 inoltre può interagire con ROR γ , un fattore di trascrizione chiave per il differenziamento di linfociti T *naive* in Th17, inibendone lo sviluppo (13).

Il repertorio antigenico riconosciuto dalle Treg. Una caratteristica fondamentale delle cellule Foxp3⁺ Treg naturali è che quando escono dal timo sono già funzionalmente mature (capaci di sopprimere) poiché incontrano già degli antigeni nel timo prima che in periferia (14). Le Treg possiedono un TCR ad alta affinità per self peptidi legati ad MHC su timociti a differenza delle altre cellule T. Topi

transgenici per uno specifico TCR , mancanti del gene che attiva la ricombinazione (Rag^{-/-}) del TCR non possiedono le Treg.

Lo sviluppo della linea delle cellule Treg sarebbe indotto in risposta all'interazione del TCR col complesso MHC-peptide *self* un grado di avidità che si colloca a metà fra la selezione positiva e quella negativa. Così l'avidità di interazione fra cellule stromali e timociti è critica per determinare lo sviluppo delle Treg. Studi recenti suggeriscono che Foxp3 non è richiesto in questa fase di selezione timica. Topi il cui gene per Foxp3 è sostituito con un gene reporter che codifica per la green fluorescence protein (GFP), i timociti GFP⁺ che non esprimono Foxp3 presentano un fenotipo tipico delle Treg (CD25⁺) ma non sono capaci di sopprimere *in vitro*. Questo significa che l'interazione tra timociti e cellule stromali coinvolge un *pathway* di interazione genica diverso da quello in cui è coinvolto Foxp3, ma l'attivazione in parallelo di Foxp3 stabilizza e sostiene il fenotipo Treg e conferisce attività soppressoria

Interleukina 2 e cellule Foxp3⁺ Treg. Interleukina 2 è un'altra molecola fondamentale per la funzione delle Treg. Il CD25 è un componente ad alta affinità del recettore per IL-2 (IL-2R) ed è funzionalmente essenziale per lo sviluppo delle Treg. Per molto tempo si è pensato che IL-2 fosse la citochina più importante per la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T poiché *in vitro* è un potente fattore di crescita. E' stato, però dimostrato che animali che non esprimono IL-2 non presentano seri problemi nel differenziamento e nella funzione delle cellule T, ma spontaneamente sviluppano malattie infiammatorie linfoproliferative con componenti autoimmuni come ad esempio l'anemia emolitica. Anche topi ko per *cd25* soccombono per disordini autoimmuni simili. Nell'uomo difetti nell'espressione del CD25 portano ad una severa autoimmunità e allergie con sintomi non molto diversi dall'IPEX. Diverse evidenze suggeriscono che questa sindrome è dovuta ad una diminuzione o malfunzionamento delle Treg: In primo luogo, infatti, topi IL-2 o CD25 ko presentano un numero ridotto di Treg e che in questi topi si può prevenire l'autoimmunità inoculando cellule T CD25⁺CD4⁺ provenienti da topi wt. In secondo luogo Topi ko per STAT5 (fattore nucleare coinvolto nel signaling attivato dal recettore di IL-2) non sviluppano cellule Treg

Foxp3⁺ (15). Infine inoculando un anticorpo monoclonale anti-IL2 in topi neonati normali si riduce il numero di cellule T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ per un periodo limitato di tempo e si presentano disordini autoimmuni simili a quelli prodotti dalla deplezione delle Treg. E' stato, inoltre, dimostrato *in vitro* che IL-2 potenzia la funzione delle Treg di sopprimere i linfociti T ed è necessaria per il mantenimento dell' espressione di Foxp3 e CD25 in queste cellule (16; 17). Sebbene ci siano altre citochine i cui recettori hanno in comune la catena γ (γ_c) con il recettore di IL-2 (IL-4, IL-7, IL-15), queste non sono in grado di sopperire completamente alla funzione di IL-2 quando si presentano difetti nell'espressione o nella funzionalità di questa citochina. Al contrario qualora si presentino difetti nell'espressione di IL-4, IL-7 o IL-15 il numero di cellule Foxp3⁺ rimane inalterato e tanto meno si verifica autoimmunità. Si può così affermare che IL-2 è vitale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule Foxp3⁺ Treg.

E' noto che IL-2 ha molti *target* cellulari: linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, linfociti B, *natural killer* (NK) ed esercita così nella risposta immunitaria una funzione pleiotropica apparentemente contraddittoria. Infatti IL-2 facilita il differenziamento dei linfociti T CD4⁺ a Th1 e Th2 e l'espansione delle cellule CD8⁺ *memory* e delle NK. D'altra parte IL-2 promuove l'apoptosi nelle cellule T attivate, mantiene le cellule Foxp3⁺ Treg, con dosi elevate ne induce l'espansione, facilita il differenziamento TGF β -dipendente delle cellule T *naive* in Treg, ma inibisce il differenziamento TGF β /IL-6-dipendente delle cellule T *naive* in cellule infiammatorie Th17 (18). Assumendo, quindi, che la maggiore fonte di IL-2 sono le cellule T attivate, esiste un feedback negativo che controlla la risposta immunitaria: IL-2 è prodotta da cellule attivate, contribuisce a mantenere l'espansione e l'attivazione delle cellule Foxp3⁺ Treg, le quali a loro volta sopprimono le cellule T attivate. L'interruzione di questo circuito provoca patologie infiammatorie e autoimmunitarie.

Generazione di cellule Treg periferiche da cellule naive. Cellule naive periferiche in particolari condizioni sperimentali come ad esempio in presenza di TGF β in coltura possono acquisire l'espressione di Foxp3 e conseguentemente la funzione di Treg (19). Nell'induzione delle Treg TGF β -dipendente *in vitro* ostacola questo

fenomeno di differenziamento di cellule T naive in cellule Foxp3⁺ e le induce a differenziare a Th17 (20). IL-2 facilita il differenziamento delle cellule CD4⁺ T naive in Treg Foxp3⁺ ma inibisce il differenziamento a Th17.

Anche l'acido retinoico secreto da un particolare subset di cellule dendritiche (DC) che si trovano in organi linfatici associati all'intestino, inibiscono l'induzione di Th17 IL-6-guidata ed in presenza di TGFβ induce differenziamento a Treg (21). Quindi somministrando proteine antigeniche le DC producenti acido retinoico associate all'intestino inducono le Treg e questa potrebbe essere un possibile meccanismo alla base della tolleranza orale. Si deve ancora bene capire se le cellule Treg indotte in periferia sono funzionalmente stabili *in vivo*, si è osservato nell'uomo che le Treg periferiche attivano Foxp3 dopo stimolazione del TCR più prontamente di quelle naturali ma l'espressione di questo fattore è più bassa e meno stabile.

Oltre alle cellule Foxp3⁺ Treg ci sono altri tipi di cellule T regolatorie che vengono indotte in periferia come ad esempio le cellule T CD4⁺ producenti IL-10 e TGFβ chiamate Tr1, *in vitro* sono indotte stimolando cellule CD4⁺ T naive con IL-10 (22). Le cellule Tr1 non esprimono Foxp3 ma le loro proprietà *in vitro* sono molto simili alle cellule Treg Foxp3⁺. Un altro tipo di cellule T regolatorie sono le Th3, sono cellule antigene-specifiche che producono TGFβ e molto spesso esprimono Foxp3. Altre sottopopolazioni di cellule T con attività regolatoria includono le CD8⁺, le CD4⁻CD8⁻, e le γ/δ ma ci sono pochissime evidenze del fatto che queste cellule giochino un ruolo cruciale nella tolleranza al *self*. E' noto che immunizzando topi con forti adiuvanti non solo si espandono cellule T CD4⁺ Foxp3⁺ ma anche CD8⁺Foxp3⁺, queste cellule plausibilmente possono corrispondere a soppressori CD8⁺ già descritti negli anni '70.

Localizzazione delle cellule Treg. Le cellule Foxp3⁺ Treg specifiche per *self*-antigeni tissutali sono localizzate nei rispettivi linfonodi periferici. Le cellule Foxp3⁺ migrano nei tessuti infiammati nei luoghi di infezione e presso i tessuti trasformati in tumori infatti oltre al TCR antigene-specifico le Treg esprimono una serie di recettori per l'*homing* come molecole di adesione e recettori per

chemochine. L'80% delle cellule Foxp3⁺ periferiche esprimono elevati livelli di CCR7, alcune esprimono CD103 che interagisce con il ligando E-caderina espresso dalle cellule epiteliali, circa il 50% esprime elevati livelli di CD62L che interagisce con le addressine vascolari CD34, GlyCAM-1, e MAdCAM-1. Questi recettori per l'*homing* controllano il traffico e la localizzazione delle Treg, inoltre il pattern di espressione di questi recettori caratterizza diversi tipi e funzionalità cellulari, ad esempio le cellule Treg Foxp3⁺ che esprimono CD103 sono *memory-like* e hanno un'attività soppressoria maggiore rispetto alle CD103⁻ sia *in vitro* che *in vivo*. In un modello di colite murina le cellule Treg Foxp3⁺ CD103⁺ sono in grado di controllare l'infiammazione nella mucosa intestinale oppure le cellule Treg Foxp3⁺ CCR5⁺ migrano preferenzialmente in lesioni cutanee dovute ad infezione da *Leishmania major* mentre le cellule Treg Foxp3⁺ CCR6⁺ vengono reclutate soprattutto nell'artrite reumatoide. Cellule ko per i recettori dell'*homing* non sono più in grado di espletare la loro funzione nei tessuti compromessi da infezione, nei trapianti, nella tolleranza madre/feto.

Attivazione, proliferazione e differenziamento delle Treg. In seguito ad esposizione dell'antigene nei linfonodi regionali, le cellule Treg Foxp3⁺ si attivano ed esercitano ad una concentrazione antigenica più bassa rispetto a quella in cui si attivano le cellule T *naive*. Questo suggerisce che le *natural* Treg possono essere attivate anche da cellule dendritiche immature che esprimono CD80/86 e il complesso MHC/peptide in maniera troppo debole per attivare linfociti T *naive self*-reattivi in modo che le Treg esercitino su questi una soppressione più forte e dominante. Al contrario delle evidenze che si sono ottenute *in vitro* le cellule Treg Foxp3⁺ *in vivo* proliferano continuamente sotto lo stimolo di *self*-antigeni e di microbi commensali. Diversi stimoli possono indurre le cellule Treg Foxp3⁺ all'espansione clonale sia *in vivo* che *in vitro* come ad esempio stimolando GITR, costitutivamente espresso cellule Treg Foxp3⁺, in presenza di IL-2 oppure i *Toll-like receptors* (TLR-2, 4, 5 e 8). Nonostante l'intensa proliferazione la percentuale di cellule Treg Foxp3⁺ è costante nei topi normali (10-15% delle cellule T CD4⁺), indicando che la morte cellulare mantiene l'omeostasi infatti la stimolazione antigenica nelle cellule Treg Foxp3⁺ *down*-regola l'espressione di Bcl-2 (proteina anti-apoptotica) (23). In conclusione le cellule Treg Foxp3⁺ migrano in tessuti

linfoidi e non, dopo essere state attivate proliferano esercitano la loro attività soppressoria e poi muoiono.

In quale modo avviene la soppressione Treg mediata? Le cellule $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Treg sopprimono la proliferazione dei linfociti T naive e il loro differenziamento in cellule effettrici, sopprimono anche cellule CD4^+ e CD8^+ già differenziate, le *Natural Killer* (NK), i linfociti B, i macrofagi, gli osteoclasti, e le cellule dendritiche. *In vitro* inibiscono la produzione di citochine (in particolare di IL-2) da parte delle cellule T quando le due popolazioni cellulari sono messe in coltura insieme e stimolate con uno stimolo antigenico in presenza di APC. Una volta attivate le cellule Treg Foxp3^+ possono sopprimere tutte le cellule T indipendentemente dalla loro specificità antigenica. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare la soppressione Treg-mediata come la secrezione da parte delle Treg di citochine immunosoppressive oppure il contatto cellula-cellula, oppure ancora il *killing* delle APC.

IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ ad esempio contribuiscono alla soppressione delle treg nell'*inflammatory bowel disease*, le cellule Treg Foxp3^+ che co-esprimono IL-10 e Foxp3 si trovano solo nella lamina propria dell'intestino ma non nella milza. $\text{TGF-}\beta$ è un mediatore della soppressione sia perché rende più sensibili le cellule T a quest'ultima sia perché mantiene l'espressione di Foxp3. Studi recenti hanno mostrato che le cellule Treg Foxp3^+ sopprimenti esprimono elevati livelli della citochina immunopressiva IL-35 (un nuovo membro della famiglia della IL-12) (24). Le cellule Treg Foxp3^+ possono anche uccidere direttamente le cellule effettrici e le APC mediante contatto cellula-cellula con un meccanismo granzima e perforine dipendente oppure inducendo nella cellula bersaglio segnali negativi come l'*up*-regolazione dell'AMP ciclico che inibisce la proliferazione delle cellule T e la produzione di IL-2. Le cellule Treg Foxp3^+ possono anche modulare negativamente CD80/86 sulle APC o stimolare le cellule dendritiche a produrre gli enzimi indoleammine 2,3-diossigenasi, le quali catabolizzano il triptofano in chiurenine sostanze tossiche per le cellule; entrambi i meccanismi sembrano essere innescati da CTLA-4 espresso sulle Treg. Mettendo insieme tutti questi meccanismi si può elaborare un modello di soppressione: (1) in seguito a

stimolazione antigenica le Treg antigene specifiche vengono attratte verso aggregati di cellule T raggruppate attorno ad APC per mezzo di chemochine prodotte dalle APC stesse; (2) Le Treg attivate modulano negativamente la funzione delle cellule dendritiche e delle cellule T attivate che si trovano lì vicino; (3) Le Treg producono citochine come IL-10, TGF- β , e IL-35 enzimi come granzime e perforine, e ciò dipende dalla forza e dalla durata della stimolazione antigenica e dal milieu citochinico che le circonda.

IL-4

Nell'uomo IL-4 è composta da 129 aminoacidi e il suo gene mappa sul cromosoma 5, mentre nel topo il *locus il-4* si trova sul cromosoma 11 nella stessa regione in cui sono presenti anche i geni per IL-3, IL-13 e GM-CSF.

IL-4 è prodotta principalmente da cellule T CD4⁺ ed anche dalle cellule NK, dai mastociti e dai basofili (25).

IL-4 è il più importante fattore di crescita per i linfociti B ed è fondamentale per lo *switch* isotipico a IgG₁ e IgE. IL-4 induce l'espressione di molecole MHC di classe II e incrementa l'espressione del recettore per le IgE (Fc ϵ RI) sui linfociti B.

Oltre che sui linfociti B, IL-4 agisce anche sulle cellule T come fattore di crescita inducendo la proliferazione di queste cellule sia umane che murine e il differenziamento dei linfociti Th verso il fenotipo Th2.

IL-4 agisce nel sistema immunitario utilizzando due tipi di recettore. Il recettore di tipo I è formato da una catena α (IL-4R α) di 140 KDa e dalla catena γ . L'espressione di questo recettore non è molto elevata, le cellule che rispondono a IL-4, infatti, esprimono poco più che un centinaio di recettori per cellula.

Il recettore di tipo II è composto da IL-4R α in associazione con la catena $\alpha 1$ del recettore per IL-13 (IL-13R α). I macrofagi, i linfociti B, e i mastociti esprimono

entrambi i tipi di recettore, mentre i linfociti T esprimono solo il recettore di tipo I (26).

Trasduzione del segnale del recettore per IL-4. L'interazione tra IL-4 e il suo recettore induce l'eterodimerizzazione della catena IL-4R α con la catena γ_c , che dà inizio alla trasduzione del segnale mediante fosforilazione di cinque residui di tirosina nella porzione citoplasmatica della catena α , cui si associa STAT6 mediante il dominio SH₂. STAT6 viene fosforilato da JAK1 e JAK3 associati entrambi al dominio intracitoplasmatico di IL4R: il primo con la catena α , il secondo con la catena γ . JAK1 e JAK3 sono capaci di fosforilare direttamente IRS-1 e IRS-2. Questi due fattori interagiscono con diverse molecole adattatrici e chinasi come Grb-2 e PI-3-K (*Phosphoinositide-3-Kinase*), che danno origine a più vie di trasduzione del segnale.

La via di trasduzione Ras/MAPK. I fattori IRS-1 e IRS-2 fosforilati interagiscono con il dominio SH₂ della molecola adattatrice Grb2, la quale forma un complesso con il fattore Sos. La funzione primaria di Sos è quella di catalizzare il cambiamento conformazionale di GDP in GTP, con la conseguente attivazione di Ras, il quale a sua volta attiva Raf. Raf dà agli eventi di fosforilazione a cascata delle MAP chinasi e delle proteine mitogeniche ERK1 e ERK2. Questi due fattori attivati traslocano nel nucleo ed inducono l'espressione di geni per i fattori di trasduzione *c-fos* e *c-Jun*.

La via di trasduzione della chinasi PI-3-K. La chinasi PI-3-K è un complesso formato da due subunità, una subunità regolatoria (p85) e una subunità catalitica (p110). Le molecole IRS-1 e IRS-2 hanno rispettivamente quattro e dieci siti di legame per p85. L'interazione della subunità p85 con le molecole IRS-1 e IRS-2 fosforilate risulta in un cambiamento conformazionale di PI-3-K che porta all'attivazione della subunità catalitica p110. Una volta attivata p110 è capace di fosforilare i lipidi di membrana, mediante il trasferimento del gruppo fosfato da

una molecola di ATP alla posizione D3 dell' inositolo convertendolo in fosfatidilinositolo-(3,4,5)-trifosfato ed in fosfatidilinositolo-(3,4)-bifosfato. Queste molecole agiscono come secondi messaggeri.

PI-3-K può fosforilare anche altre proteine come la chinasi Akt che gioca un ruolo fondamentale sulla sopravvivenza dei linfociti (27). Infatti Akt è in grado di fosforilare il fattore pro-apoptotico BAD. Questo fattore non fosforilato promuove l'apoptosi mediante il legame con Bcl-2. Questo legame, infatti, neutralizza Bcl-2, un fattore che al contrario di BAD previene la morte cellulare. Quando BAD viene fosforilato da Akt, BAD si lega alle proteine 14-3-3, le quali

Cellule Treg e IL-4. L'effetto di IL-4 sulle cellule regolatorie è duplice, poiché essa appare coinvolta sia nel mantenimento che nella proliferazione delle cellule Treg sia nell'inibizione della loro attività regolatoria, contrastando la soppressione della proliferazione linfocitaria indotta dalle cellule Treg. IL-4 quindi sembra favorire da una parte l'induzione di una risposta immunitaria di tipo Th2 molto efficiente e protettiva, e dall'altra l'insorgere di stati patologici di tipo autoimmunitari. In un lavoro di Rivet è riportato che topi che esprimono costitutivamente IL-4 mostrano un'a grave iperattivazione del sistema immunitario, dato dall'incremento delle immunoglobuline sieriche IgG e IgE e un aumento dell'espressione di molecole MHC II che inducono una maggiore attivazione della risposta Th2. Tutto ciò si riflette in una mortalità dell'animale in giovane età, dovuta allo sviluppo di anemia e glomerulonefrite. Trattando l'animale con Ab contro IL-4, questo risulta protetto dallo sviluppo di questi disordini autoimmunitari, confermando che IL-4 è la citochina maggiormente coinvolta nell'induzione di sindromi autoimmunitarie in questo modello murino (28).

In esperimenti condotti *in vitro* viene dimostrata la capacità di tale citochina di inibire l'attività soppressoria delle cellule Treg mediante l'attivazione del fattore antiapoptotico Bcl-2. Inoltre si dimostra che le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg inibiscono la produzione di IL-4 da parte delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th2 e che in tale condizione aumenta la produzione di $IFN\gamma$ che favorisce una risposta immunitaria di tipo Th1 (29).

IFN γ

Gli interferoni (IFN) costituiscono uno dei principali meccanismi di difesa della immunità innata. Queste citochine si dividono in due classi principali: classe I e classe II. Alla prima appartengono IFN α e IFN β , i quali utilizzano gli stessi recettori di trasduzione del segnale, e svolgono funzioni simili: attività antivirale e antiproliferativa, attivazione citolitica dei linfociti, delle NK e dei macrofagi.

IFN γ appartiene alla classe II, è codificato da un singolo gene localizzato sul cromosoma umano 12 e sul cromosoma murino 10. IFN γ è prodotto dalle NK, dai linfociti T CD8⁺, e da tutti i linfociti Th1 in risposta a stimoli esogeni come antigeni virali e batterici e da stimoli endogeni come IL-12 o IL-18. Agisce attraverso specifici recettori che sono espressi su tutte le cellule tranne che sugli eritrociti. Il recettore è costituito da due catene: IFNGR-1 e IFNGR-2. La catena IFNGR-1 è necessaria per il legame della citochina, mentre IFNGR-2 è coinvolta nella trasduzione del segnale. IFN γ svolge un importante ruolo nel controllo delle infezioni virali, nella risposta infiammatoria poiché attiva i macrofagi, inducendo l'espressione delle molecole MHC II, aumenta la produzione di IL-1 e IL-2, promuove il differenziamento dei linfociti B, dei monociti e dei linfociti Th1, per i quali agisce come fattore di crescita per via autocrina mentre inibisce il differenziamento e lo sviluppo dei linfociti Th2. Difetti nel signaling di IFN γ generano una risposta immunitaria improduttiva contro le infezioni microbiche e batteriche.

IL-17

La famiglia delle citochine Th17 include 6 membri (da IL-17 A a IL-17F), strutturalmente omologhe l'una con l'altra. IL-17 è prodotta preferenzialmente dai linfociti T CD4⁺ Th17, ma anche dai linfociti T CD8⁺, NK, linfociti T γ/δ , neutrofili, monociti ed eosinofili. Numerose evidenze dimostrano che le cellule Th17 sono strettamente legate alle cellule Treg, infatti entrambe richiedono il TGF- β per differenziare, le Th17 richiedono anche IL-6, che è prodotta da macrofagi e DC mediante attivazione dei Toll-like receptor.

IL-6 attiva la via di STAT3 che porta alla attivazione di ROR γ , fattore di trascrizione necessario per il differenziamento a Th17.

Il recettore di IL-17 è espresso su cellule del sistema immunitario e non, questo attraverso il legame con la citochina promuove l'infiammazione, inducendo il rilascio di fattori proinfiammatori come IL-6, TNF- α , IL-1 e chemochine che guidano il reclutamento di neutrofili e monociti nel sito di infiammazione (come IL-8, CXCL1 ligando 1). Le cellule Th17 sono essenziali per la difesa contro patogeni come *Klebsiella pneumoniae* o *Citrobacter rodentium*. La presenza di cellule produttrici IL-17 è stata osservata in molte patologie autoimmuni umane come il morbo di Crohn, la colite ulcerativa, la psoriasi, la dermatite da contatto, sclerosi multipla e diabete autoimmune. In vitro le cellule Th17 e le cellule Treg sono reciprocamente regolate. Le cellule Treg producono TGF- β che da un lato sopprime le cellule Th1 e Th2 regolando negativamente i loro rispettivi fattori di trascrizione (T-bet e GATA3), dall'altro regola positivamente ROR γ T e Foxp3 inducendo fenotipo Th17 e Treg.

In vivo in modelli di autoimmunità indotta dal trasferimento di cellule T in topi Rag2^{-/-}, le cellule Treg inibiscono la proliferazione delle cellule Th17 ma non la produzione di IL-17 da parte di queste. In un modello di encefalomielite

autoimmune Le cellule Th17 in parte riescono a resistere alla soppressione delle cellule Treg grazie alla produzione di TNF- α e IL-6.

IMMUNO BOWEL DISEASE.

L'intestino costituisce un ambiente immunitario particolarmente importante, necessario per garantire la tolleranza verso gli antigeni presenti negli alimenti e nei confronti dei microrganismi commensali, che costituiscono la flora intestinale. Inoltre, il sistema immunitario associato all'intestino costituisce un'importante difesa contro l'invasione di microrganismi potenzialmente patogeni. A livello delle placche di Peyer, organi linfoidi secondari, viene generata la risposta immunitaria, in quanto queste ricevono un'agrande quantità di antigeni, grazie a particolari cellule dell'amucosa intestinale, dette cellule M, che sono specializzate nella cattura e nel trasporto degli antigeni.

Le cellule T regolatorie un importante meccanismo di controllo di disordini autoimmunitari che interessano l'apparato digerente e denominati IBD (Immuno bowel diseases) che comprendono il morbo di Crohn, la colite ulcerosa e la gastrite.

Il colon è la parte più estesa dell'intestino crasso, che svolge l'importante compito di assorbire l'acqua e produrre le feci. Esso non possiede villi come l'intestino tenue, ma è ricco di ghiandole tubulari semplici che assorbono l'acqua e producono muco collocate nelle cripte di Lieberkühn.

Nell'uomo il colon si può dividere in quattro segmenti: ascendente, trasverso, discendente e sigmoide. Ogni segmento è formato da strati istologicamente distinguibili in : mucosa, sottomucosa, *muscularis* esterna e avventizia.

La colite si manifesta nel tratto discendente del colon ed è caratterizzata da una rilevante distruzione tissutale che può presentare notevoli ulcerazioni a livello della mucosa.

Istologicamente si può notare il massiccio infiltrato linfocitario nella mucosa e nella sottomucosa con perdita della struttura ghiandolare delle cellule mucipare.

La colite ulcerosa è una patologia autoimmune dovuta ad un'inflammatione cronica che colpisce il colon mediante una risposta cellulo-mediata di tipo Th1, attivata inizialmente contro i batteri commensali dell'intestino. Ciò è stato dimostrato dall'uso di topi immunodeficienti cresciuti in condizioni di sterilità che non sviluppano la colite (30).

Sono stati creati diversi modelli murini che riproducono questa patologia umana, per studiare il comportamento delle cellule Treg nel corso dell'inflammatione.

A tale scopo il lavoro di F. Powrie del 2000 (15 bea) dimostra come le cellule Treg possano migliorare in maniera significativa il decorso della patologia. La colite viene indotta in topi Rag-/- (privi di linfociti B e T, caratterizzati solo dalla componente innata del sistema immunitario: nk e macrofagi) mediante l'inoculo di cellule T $CD4^+ CD25^- CD45RB^{high}$ provenienti da un topo singenico. Dopo quattro settimane i topi cominciano a manifestare i sintomi della patologia come diarrea, notevole perdita di peso e inflammatione anale. Il trasferimento di cellule $CD4^+ CD25^+$ Treg o $CD25^- CD45RB^{low}$ in topi affetti da colite porta ad un miglioramento della sintomatologia clinica in circa due settimane, rispetto ai topi che non hanno ricevuto le cellule Treg e che invece mostrano un aggravarsi dei sintomi.

Si è recentemente osservato che TGF- β e il suo recettore svolgono un ruolo importante nella inibizione della colite autoimmune indotta sperimentalmente in topi che possiedono una mutazione dominante negativa nel recettore del TGF- β (dnT β RII). Tale recettore non permette la trasduzione del segnale mediato dal legame della citochina. Questo comporta che le cellule T attivate non capaci di rispondere al TGF- β sfuggono al controllo delle cellule Treg (16 bea). L'analisi dei dati mostra che in topi inoculati con $CD4^+ CD25^- CD45RB^{high}$ Th, le cellule Treg riescono a controllare l'inflammatione a livello intestinale e a migliorare la condizione patologica, ciò non avviene in topi in cui la colite è stata indotta da cellule $CD4^+ CD25^- CD45RB^{high}$ dnT β RII $^{-/-}$. Questi risultati mostrano come l'inibizione delle cellule T $CD4^+$ autoreattive richiede l'azione diretta del TGF-

β su tali cellule, in modo da limitarne l'accumulo nel colon. Infatti l'assenza del segnale indotto dal TGF- β porta alla formazione di aggregati linfocitari attivi sia nei polmoni sia nel colon e alla formazione di anticorpi circolanti, che conducono all'insorgenza della colite e altri disordini autoimmunitari. Questi risultati dimostrano che le cellule prive del recettore per questa citochina sono refrattarie al controllo da parte delle cellule Treg. Tutto ciò conferma il ruolo del TGF- β come una citochina di fondamentale importanza nel controllo e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare mediata dalle cellule Treg.

Un altro fattore coinvolto nell'inibizione della colite autoimmune è il recettore CTLA-4. tale molecola è espressa solo sui linfociti attivati e trasduce un segnale inibitorio.

Topi CTLA4^{-/-} mostrano l'insorgenza di gravi disordini linfoproliferativi. In modelli murini di colite si dimostra che l'inattivazione di tale recettore, mediante anticorpi bloccanti, porta all'arresto funzionale delle cellule Treg, che non sono più capaci di inibire la colite. Tutto ciò mette in evidenza l'importanza svolta da questo recettore nell'inibizione della colite da parte delle cellule Treg (17 bea).

Lo sviluppo della colite è guidato dall'accumulo di cellule dendritiche (DC) nei linfonodi mesenterici. Il trasferimento di cellule CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} Treg inibisce tale accumulo e riduce i sintomi.

Studi condotti nell'induzione della colite, hanno messo in luce che una particolare classe di molecole appartenenti alla famiglia del TNF (come CD134 e il suo recettore espressi sulle Dc, sui linfociti B e T) giocano un ruolo importante nello sviluppo di questa patologia. Il legame del CD134 al suo recettore induce ulteriore attivazione e proliferazione cellulare aumentando l'intensità della risposta immunitaria. L'inoculo di cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} Th in topi SCID (*severe combined immunodeficiency*) inducono l'accumulo di DC CD134L⁺ attivate nel linfonodo mesenterico mentre l'inoculo di cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} Th insieme alle cellule CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} Treg previene questo evento e limita lo sviluppo della colite.

L'ipotesi effettuata è che l'inflammatione indotta dai batteri commensali, durante lo sviluppo della colite richiami nella lamina propria del colon le DC che riconoscendo antigeni *self* e non, si attivano e migrano nel linfonodo mesenterico dove inducono l'attivazione delle cellule T. In assenza delle cellule Treg, le DC CD134L⁺ portano ad un'espansione non controllata delle cellule Th, che sotto lo stimolo di IL-12 si differenziano a Th1 portando ad una risposta cellulo-mediata che causa i danni della patologia. L'aumento dell'inflammatione induce a sua volta un maggior reclutamento di DC e a un peggioramento dei sintomi. Le Treg bloccano l'attivazione delle DC nel linfonodo mesenterico.

Il lavoro di F. Powrie del 1998 (18 bea) dimostra che le cellule CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} Treg inibiscono la risposta Th1 che porta allo sviluppo della colite autoimmune mediante TGF- β . Anticorpi bloccanti TGF- β inducono lo sviluppo della colite.

SCOPO DELLA TESI

Gli studi condotti fino a poco tempo fa sulle cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regolatorie dimostravano tutti che queste cellule coltivate *in vitro* con APC, cellule Th e uno stimolo antigenico sono capaci di sopprimere le cellule Th in modo proporzionale al numero di cellule Treg messe in coltura ma incapaci di proliferare risultando così anergiche. In presenza dello stimolo proliferativo IL-2 le cellule Treg proliferano ma con un tasso di proliferazione nettamente inferiore a quello delle cellule Th nonostante esprimano sulla loro superficie una elevata quantità di CD25 che è la catena α del recettore per IL-2 (CD25).

Studi più recenti mostrano che in realtà *in vivo* le cellule Treg sono tutt'altro che anergiche. Lo scopo del presente lavoro è stato l'approfondimento del ruolo delle cellule $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regolatorie *in vitro* ma soprattutto *in vivo*. Il ruolo della citochina IL-4 è stato analizzato nella soppressione delle cellule Th mediata dalle cellule Treg.

Studi preliminari condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'aggiunta della citochina IL-4 a co-colture di cellule $CD4^+CD25^-$ Th, cellule $CD4^+CD25^+$ Treg e APC inibisce la soppressione della proliferazione delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th mediata dalle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg in maniera dose dipendente.

Uno degli scopi di questa tesi è quello di individuare il meccanismo con il quale IL-4 inibisce la soppressione mediata dalle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg sulla

attivazione delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th. La catena α del recettore per IL-4 (IL-4R α) è espressa da un'ampia varietà di tipi cellulari tra cui le cellule $CD4^+CD25^-$ Th, le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg e le APC. Per superare questa difficoltà, nel presente studio, è stato analizzato l'effetto di IL-4 sulla funzione attivante delle APC, sulla sensibilità alla soppressione delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th e sulla attività soppressoria delle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg, allestendo co-culture con cellule provenienti da topi *wild type* (IL-4R $\alpha^{+/+}$) o da topi *knock out* (IL-4R $\alpha^{-/-}$).

E' stata, inoltre, analizzata l'espressione della molecola anti-apoptotica Bcl-2 nei linfociti $CD4^+CD25^-$ Th soggetti alla soppressione esercitata dalle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg in presenza o assenza di IL-4.

Allo scopo di confermare *in vivo* i risultati ottenuti *in vitro* questi studi sono stati estesi a un modello di colite atoimmune. A tal fine sono stati inoculati topi SCID con cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ Th IL-4R $\alpha^{+/+}$ oppure IL-4R $\alpha^{-/-}$ e osservate le differenze nella progressione della patologia nei sintomi nell'attivazione del sistema immunitario nel *pattern* di citochine prodotte nelle due diverse condizioni sperimentali.

MATERIALI E METODI

TOPI

Topi C57Bl/6 di otto/dodici settimane sono stati acquistati dalla *Charles River Laboratories*.

Topi *knock out* per la catena α del recettore per la citochina IL-4 (IL-4R $\alpha^{-/-}$), femmine di otto/dodici settimane con *background* genetico C57 Bl/6 sono stati allevati presso lo stabulario dell'Università di tor Vergata .

Topi Rag2 $^{-/-}$ con background genetico C57Bl/6, di sei/sette settimane ed allevati presso lo stabulario di Tor Vergata in *condizioni pathogen free*. Inoculati con cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ CD45RB high o CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ CD45RB low (400×10^3 /topo) sacrificati dopo 40gg.

ANTICORPI E REAGENTI

I seguenti anticorpi e reagenti secondari coniugati a ficoeritrina (PE), fluoresceinaisotiocianato (FITC) o biotinilati sono stati acquistati dalla *BD Pharmingen*: anti-CD25 (7D4), anti-CD4, anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti-CD16 Fc Block (2.4G2), e il suo controllo isotipico . Anti-IL-4R α (sc-686) e anti-Bcl-2 (sc-492) sono stati acquistati dalla *Santa Cruz Biotechnology*. Anti- β -actina (AC-15) è

stata ottenuta dalla *Sigma-Aldrich*. La citochina IL-4 (404-ML) e IL-2 sono state acquistate rispettivamente dalla *R&D Systems* e da *BD Pharmingen*. Anti-BrdU acquistata dalla *BD pharmingen*.

PURIFICAZIONI CELLULARI

Tutte le cellule sono state ottenute mediante un sistema di purificazione immunomagnetico secondo il protocollo del produttore (*Miltenyi Biotec*). Gli splenociti sono stati lavati in soluzione salina e privati degli eritrociti mediante lisi osmotica. Le APC sono state preparate mediante deplezione di cellule CD90⁺ utilizzando microbiglie anti-CD90 e il sistema di separazione magnetica VarioMACS. Le cellule CD4⁺ sono state purificate utilizzando il *kit* MACS *MultiSort*. Le cellule CD4⁺CD25⁺ T regolatorie sono state purificate mediante marcatura delle cellule CD4⁺ con anti-CD25 biotinilato e microbiglie coniugate alla streptavidina. Le cellule ottenute, da un'analisi al citofluorimetro, risultano pure al 95%-99%

SORTING CELLULARE

Dopo 3 giorni di co-cultura, cellule CD4⁺CD25⁻ Th CFSE⁺ sono state isolate mediante il separatore di cellule *FACS Vantage cell sorter* (*BD Biosciences*). Il CFSE è una molecola che entra nelle cellule e forma legami esteri con le proteine intracellulari, è una molecola fluorescente così che le cellule marcate possono essere distinte dalle altre mediante citofluorimetria. La purezza delle cellule isolate è del 99.8%.

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE

APC trattate con mitomicina C (5×10^4) e cellule $CD4^+ CD25^-$ Th (2.5×10^4) purificate come descritto sopra, sono state messe in co-coltura per 3 giorni in presenza di un numero crescente di cellule $CD4^+ CD25^+$ Treg in piastre da 96 pozzetti a fondo tondo (*Corning; Costar*) in terreno RPMI 1640 *medium* (*Invitrogen life technologies*), a cui è stato aggiunto 10% FCS (*Invitrogen life technologies*), glutammina (*Euroclone*), penicillina e streptomina (*BioWhittker*), $50 \mu\text{M}$ 2-ME, e aminoacidi non essenziali (*Invitrogen Life Technologies*) in presenza di $1 \mu\text{g/ml}$ di un anticorpo anti-CD3 ϵ . Alla coltura è stata aggiunta IL-4 (10 ng/ml). La proliferazione dei linfociti è stata osservata dopo 72 h di coltura monitorando l'incorporazione di [^3H]TdR aggiunta alla coltura e misurata dopo 4h utilizzando il Matrix 96 Direct Beta Counter (Packard). Il grado di soppressione esercitato dalle cellule $CD4^+ CD25^+$ Treg sulle cellule $CD4^+ CD25^-$ Th è espresso come $100 \times (\text{cpm delle } CD4^+ CD25^- \text{ Th} - (\text{cpm delle Th} + \text{Treg}) / \text{cpm delle } CD4^+ CD25^- \text{ Th})$.

TITOLAZIONE DELLE CITOCHINE

Le citochine sono state titolate analizzando i soprannatanti delle colture mediante ELISA (*Endogen minikit*). E' stata aggiunta Avidina perossidasi (A3151-Sigma; Sigma-Aldrich; 1/1000). Il substrato che è stato utilizzato è l'ABTS (*Kirkegaard & Perry Laboratories*). L'assorbanza è stata misurata a 405 nm.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state marcate con CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester(5(6)-CFDA, SE) 5µM (*Molecular Probes*) per 5 min a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate e messe in coltura in piastre da 96 pozzetti a fondo tondo. Dopo tre giorni, le cellule sono state prelevate, analizzate e separate con il *Facs Vantage sorter*. Splenociti sono stati marcati con anti-CD4 coniugato a ficoeritrina (PE), e con anti-CD25 coniugato a fluoresceinaisotiocianato (FITC) acquistati dalla *BD Pharmingen*. Campioni contenenti 2.5x10⁵ cellule sono stati analizzati mediante un FACSCalibur (*BD Biosciences*), utilizzando il programma *CellQuest* (*BD Biosciences*). dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th è espresso come 100x(cpm delle CD4⁺CD25⁻ Th- (cpm delle Th +Treg)/ cpm delle CD4⁺CD25⁻ Th).

WESTERN BLOT (WB)

Le cellule sono state lisate per 10 min in ghiaccio nella soluzione di lisi (1mM MgCl₂ 350 mM NaCl, 20mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na₄P₂O₇, 1 mM PMSF, 1.5 mM leupeptina, 1.5mM aprotinina, 1% di una mix inibitore di fosfatasi (P5726; *Sigma-Aldrich*), 20% glicerolo e 1% Nonidet-P40). Le cellule così lisate sono state centrifugate a 11000 g per 15 min. I sopranatanti sono stati bolliti per 10 min, separati mediante elettroforesi SDS-PAGE in un gel al 12%, e trasferiti su una membrana *Hybond-P transfer* (*Amersham Biosciences*). La membrana è stata bloccata per tutta la notte con reagenti di *blocking* (*Amersham Biosciences*) a 4°C e successivamente incubata con gli anticorpi indicati per 60 min a temperatura ambiente. La membrana è stata, poi, lavata e incubata con anticorpi secondari coniugati alla fosfatasi alcalina per 60 min a temperatura ambiente. La presenza delle proteine è stata rilevata con un

substrato per elettrochemiofluorescenza (ECF) secondo il protocollo del produttore (*Amersham Biosciences*) e acquisito mediante lo strumento phosphor/fluorescence imager Storm 860 (*Molecular Dynamics*). L'intensità delle bande è stata quantificata mediante il software *ImageQuant* (*Molecular Dynamics*). I risultati sono mostrati con la β -actina come controllo.

ISTOLOGIA

Il colon è stato fissato in liquido di Bouin ed incluso in paraffina.

Le sezioni sono state tagliate al microtomo allo spessore di 4 μ e colorate con emallume Carazzi ed Eosina. Sono state visualizzate al microscopio ottico a ingrandimento 20x.

Il danno tissutale (colite score) è stato valutato secondo una scala di punteggi che vanno da un valore minimo di 1 ad un valore massimo di 4 valutando l'integrità della mucosa, la presenza di cellule mucipare, ulcerazioni, infiltrati linfocitari nella mucosa e nella sottomucosa.

ANALISI STATISTICA

Gli esperimenti mostrati sono stati ripetuti almeno tre volte. Per ogni punto sperimentale è stata calcolata la deviazione standard dalla media. La deviazione standard del rapporto tra le medie è stata calcolata secondo la formula di Finney ed è risultata $\leq 0,03\%$.

RISULTATI

1. LE CELLULE CD4⁺CD25⁺ TREG SOPPRIMONO L'ATTIVAZIONE E LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE CD4⁺CD25⁻ TH

Per valutare l'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, sono state allestite coculture in vitro di cellule CD4⁺CD25⁻ Th attivate con lo stimolo policlonale anti-CD3 mAb in presenza di APC. In queste condizioni sperimentali le cellule Th proliferano e producono IL-2. A questa cocultura sono state aggiunte cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in numero crescente. Le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg non proliferano in presenza di APC e anti-CD3 mAb.

I risultati della figura 1 mostrano che la proliferazione (fig. 1A) e la produzione di IL-2 (fig. 1B) da parte delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono inibite in maniera crescente con l'aumentare del numero di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg aggiunte alla coltura.

2. CD25 GIOCA UN RUOLO FONDAMENTALE NELLA SOPPRESSIONE MEDIATA DALLE CELLULE CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T REGOLATORIE.

Una volta verificato che le cellule Treg in vivo proliferano e sapendo dalla letteratura che IL-2 è il più importante agente trofico, si è cercato di capire in che modo la IL-2 e il suo recettore CD25 modulino la proliferazione e l'attività di soppressione di queste cellule.

Partendo dal presupposto che CD25 (catena a del recettore per IL-2) è espresso sulla membrana cellulare delle Treg in quantità elevata si è pensato di bloccare

questo recettore con un anticorpo anti-CD25 evitando in questo modo il legame al suo ligando (IL-2).

Un anticorpo anti-CD25 (PC61) purificato da un ibridoma o un controllo isotipico sono stati inoculati per via intraperitoneale in topi C57/bl6. Dopo 3 giorni i topi sono stati sacrificati e la milza e i linfonodi ascellari marcati con anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3 ciò che si osserva in figura 2 che sia nella milza che nel linfonodo i topi inoculati con anti-CD25 hanno una diminuzione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg sia in percentuale che in media di fluorescenza (Fig 2A).

L'esperimento è stato ripetuto in un modello di risposta antigene-specifico, topi C57/bl6 sono stati inoculati per via intraperitoneale con anti-CD25, e dopo 3gg i medesimi topi sono stati immunizzati con l'antigene ovalbumina (peptide OVA323) o con il controllo isotipico con l'adiuvante IFA.

Dopo il sacrificio da tutti i gruppi sperimentali sono state purificate le cellule del linfonodo inguinale messe in coltura con APC mitomicinate e lo stimolo policlonale α CD3 dopo tre giorni si è valutata la proliferazione delle cellule Th.

Fig 2B. si osserva che nei topi inoculati con il controllo isotipico (barre grigio scuro e nera) si ha una bassa proliferazione delle cellule Th anche nei gruppi stimolati con l'antigene, mentre nei topi inoculati con l' α CD25 le cellule proliferano in misura maggiore (barra bianca e grigio chiaro). Si può evincere da questo esperimento che impedendo il legame IL-2/CD25 sulle Treg si ha un blocco della attività soppressoria di queste cellule. Quindi l'esperimento conferma che IL-2 è fondamentale per le cellule Treg sia per proliferare sia per espletare la loro funzione soppressoria sull'attivazione delle cellule Treg.

3 .IL-4 PROMUOVE LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE CD4⁺ CD25⁻ TH E DELLE CELLULE CD4⁺CD25⁺ TREG

Al fine di capire quale fosse l'effetto di IL-4 sulla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, sono state allestite colture con cellule CD4⁺CD25⁻ Th o con cellule CD4⁺CD25⁺ Treg stimulate con l'attivatore policlonale anti-CD3 mAb in presenza di APC per 48 h ed in presenza o in assenza di IL-4. La proliferazione cellulare è stata determinata mediante l'incorporazione di [³H]TdR.

La figura 3 mostra che in presenza di IL-4 si verifica un incremento della proliferazione sia delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th sia delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

4. IL-4 PROTEGGE LE CELLULE CD4⁺CD25⁻ TH DALLA SOPPRESSIONE MEDIATA DALLE CELLULE CD4⁺CD25⁺ TREG.

Per valutare l'effetto di IL-4 sulla attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, la citochina è stata aggiunta al saggio di soppressione mostrato nella figura precedente. A tal fine, cellule CD4⁺CD25⁻ Th oppure cellule CD4⁺CD25⁻ Th più cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sono state coltivate in ugual numero in presenza di APC, e stimulate per 3 giorni con anti-CD3 mAb e con concentrazioni crescenti di IL-4.

La proliferazione cellulare è stata determinata mediante l'incorporazione di [³H]TdR. La soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sulla risposta proliferativa delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th è espressa come percentuale di inibizione calcolata rispetto ai valori osservati in assenza di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg nelle coculture, come riportato nei materiali e metodi.

I risultati della figura 4 mostrano che l'aggiunta di IL-4 inibisce la soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in maniera dose-dipendente.

5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA CATENA IL-4R α SULLE POPOLAZIONI CELLULARI.

Per capire quali cellule nelle coculture fossero bersaglio dell'azione di IL-4 nella soppressione, è stata analizzata l'espressione della catena IL-4R α in APC, in cellule CD4⁺CD25⁺ Treg e CD4⁺CD25⁻ Th. Queste popolazioni cellulari sono state purificate da topi wild type e successivamente lisate per ottenere estratti proteici totali. Le proteine estratte sono state separate mediante elettroforesi (SDS-phage) e successivamente è stata rilevata l'espressione della catena recettoriale IL-4R α mediante W.B.

I risultati riportati in figura 5 mostrano che la catena IL-4R α è espressa con livelli molto simili in tutti i tipi cellulari esaminati.

6. ESPRESSIONE DI IL-4RA IN TOPI IL-4R α ^{+/+} ED IN TOPI IL-4R α ^{-/-}

Poiché tutti i tipi cellulari coinvolti nella co-coltura esprimono la catena IL-4R α (fig. 5), non è possibile predire quale sia il bersaglio cellulare dell'azione di IL-4 nel blocco della soppressione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Per tali considerazioni, sono state allestite co-culture in vitro utilizzando cellule provenienti da topi wild type (IL-4R α ^{+/+}) o ko (IL-4R α ^{-/-}), allo scopo di chiarire il meccanismo con cui IL-4 interferisce con la soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

Allo scopo di verificare che i topi *konck out* per la catena α del recettore per IL-4 (IL-4R $\alpha^{-/-}$) non esprimessero la catena IL-4R α , splenociti prelevati da topi *wild type* (IL-4R $\alpha^{+/+}$) e da topi IL-4R $\alpha^{-/-}$ e sono stati lisati per ricavare degli estratti proteici totali. Quest'ultimi sono stati utilizzati per verificare l'espressione della catena recettoriale IL-4R α mediante la tecnica del W.B. (Fig 6).

La figura 6 mostra che gli splenociti isolati dai topi IL-4R $\alpha^{-/-}$ non esprimono la catena recettoriale IL-4R α . Viceversa splenociti isolati da topi IL-4R $\alpha^{+/+}$ esprimono la catena recettoriale IL-4R α .

7. L'ESPRESSIONE DELLA CATENA IL-4R α PROTEGGE LE CELLULE CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ TH DALLA SOPPRESSIONE.

Come è stato precedentemente riportato in figura 4 IL-4 interferisce negativamente sulla soppressione mediata dalle cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg favorendo la proliferazione delle cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th. Poiché la catena recettoriale IL-4R α è espressa su diversi tipi cellulari, tra cui le cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th, le cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg e le APC (fig. 5) che sono coinvolte nel saggio di soppressione in vitro, l'inibizione della soppressione da parte di IL-4 è stata analizzata utilizzando coculture di cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th, cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg e APC purificate da topi IL-4R $\alpha^{+/+}$ e da topi IL-4R $\alpha^{-/-}$ secondo una matrice di 8 combinazioni cellulari (Fig. 7A).

I risultati sono riportati in figura 7.

I risultati riportati nel pannello 7B rappresentano la percentuale di proliferazione di cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th IL-4R $\alpha^{+/+}$ in presenza di cellule CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg IL-

4R α ^{+/+} o IL-4R α ^{-/-} messe in cocoltura in presenza o in assenza di IL-4. Le cellule sono state stimulate con anti-CD3 mAb in presenza di APC IL-4R α ^{+/+}.

La figura 7B dimostra che cellule CD4⁺CD25⁺ Treg che non esprimono la catena IL-4R α presentano la medesima capacità di sopprimere delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4R α ^{+/+}. L'aggiunta di IL-4 a questa cocoltura determina un aumento della proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4R α ^{+/+} coltivate in presenza di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4R α ^{-/-} (curva celeste) molto simile a quella che si verifica quando tutte le popolazioni cellulari esprimono la catena IL-4R α (curva blu).

La figura 7C mostra l'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4R α ^{+/+} o IL-4R α ^{-/-} su cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4R α ^{+/+} in presenza di APC IL-4R α ^{-/-}. Quando le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg non esprimono IL-4R α , l'aggiunta di IL-4 alla cocoltura non ha effetto. Al contrario IL-4 protegge le cellule CD4⁺CD25⁻ Th dalla soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, poiché solo le cellule CD4⁺CD25⁻ Th che esprimono IL-4R α sembrano essere refrattarie all'azione soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. In assenza della catena recettoriale IL-4R α , le cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4R α ^{-/-} sono soppresse nella proliferazione sia in presenza che in assenza di IL-4. Nel caso in cui, invece, le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4R α ^{+/+} sono messe in cocoltura con cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4R α ^{-/-} aggiungendo al terreno di coltura IL-4 inaspettatamente si osserva un incremento complessivo della risposta proliferativa.

Le medesime cocolture sopra-descritte sono state fatte in presenza di APC IL-4R α ^{-/-} per verificare se IL-4 agisca su queste cellule. I risultati escludono che IL-4R α espresso dalle APC possa avere un ruolo nella inibizione della soppressione mediata da IL-4.

8. ESPRESSIONE DEL FATTORE ANTI-APOPTOTICO BCL-2 IN CELLULE CD4⁺CD25⁻ TH .

E' noto che IL-4 previene la morte di cellule CD4⁺ Th sia *naive* che attivate poiché induce l'espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2. Questa osservazione ha portato ad analizzare quale fosse il livello di espressione di Bcl-2 in cellule CD4⁺CD25⁻ Th messe in cocoltura con cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza o in assenza di IL-4.

Allo scopo di distinguere le cellule CD4⁺CD25⁻ Th dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg messe in cocoltura, le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state trattate con CFSE, un marcatore della divisione cellulare, prima di essere messe in coltura con le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg e con le APC.

Le cellule CFSE⁺ CD4⁺CD25⁻ Th sono state messe in coltura con APC in presenza o in assenza di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg con o senza l'aggiunta di IL-4. Dopo 3 giorni di coltura, le cellule CFSE⁺ CD4⁺CD25⁻ Th sono state isolate mediante un separatore di cellule, il FACS-Vantage, e sono state lisate per estrarre le proteine totali. Su questi estratti è stata analizzata l'espressione di Bcl-2 mediante la tecnica del W.B.

I risultati sono riportati in figura 8.

Quando le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono attivate in presenza di APC e con anti-CD3 mAb, si osserva un aumento dell'espressione di Bcl-2 rispetto alle cellule CD4⁺CD25⁻ Th lisate al tempo 0, corrispondente all'inizio della coltura, prima di essere messe in coltura. Con l'aggiunta di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg si osserva una riduzione del livello di espressione di Bcl-2, ma quando alla cocoltura viene aggiunta IL-4, questo effetto negativo delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th è prevenuto.

Quindi aggiungendo IL-4 il livello di espressione di Bcl-2 nelle cellule CD4⁺CD25⁻ Th aumenta di nuovo.

9. LE CD4⁺CD25⁺ TREG INIBISCONO LA PRODUZIONE DI IL-2 DA PARTE DELLE CD4⁺CD25⁻ TH IN PRESENZA DI IL-4

Oltre alla soppressione della proliferazione, è noto che le CD4⁺CD25⁺ Treg inibiscono la produzione di IL-2 da parte cellule CD4⁺CD25⁻Th.

Poiché l'inibizione della produzione di IL-2 è stata osservata anche in presenza di proliferazione delle cellule Treg, nel presente studio è stata analizzata la produzione di IL-2 sui sopranatanti della coltura in figura 9, mediante test ELISA.

I risultati riportati in figura 9 mostrano che le cellule Treg come osservato in figura 1B inibiscono la produzione di IL-2 da parte delle cellule Th anche in presenza della citochina IL-4.

Quindi le cellule Treg mantengono intatta la capacità di inibire la produzione di IL-2 da parte delle Th, anche in presenza di IL-4.

10. LE CELLULE CD4⁺CD25⁺ CD45RB^{LOW} TREG INIBISCONO LO SVILUPPO DELLA COLITE AUTOIMMUNE

*L'attività inibitoria delle cellule Treg può essere studiata "in vivo" in un modello di colite autoimmune, indotta in topi SCID in seguito all'inoculo di cellule CD4⁺CD45RB^{low}, alle quali appartiene la sottopopolazione di cellule Treg. In figura 10 si è mostrata la popolazione cellulare delle CD4⁺ totali purificate dalla milza dei topi (A). I pannelli B e C mostrano la distribuzione delle sottopopolazioni CD4⁺CD45RB^{high} e CD4⁺CD45RB^{low} dopo il *sorting* cellulare. I*

topi sono stati divisi in tre gruppi sperimentali. E' stato analizzato l'andamento del peso corporeo, durante la settimana recedente l'inoculo di cellule singeniche per via intraperitoneale (Fig. 11A).

Nella figura 11 B il primo gruppo ha ricevuto cellule $CD4^+CD45RB^{high}$ Th più il 10% di $CD4^+CD45RB^{low}$ Treg, il secondo gruppo è stato ripopolato con linfociti T $CD4^+$ totali ($CD4^+CD45RB^{high}$ + $CD4^+CD45RB^{low}$, in un rapporto 1:1), il terzo gruppo ha ricevuto solo linfociti $CD4^+CD45RB^{low}$.

Dalla data dell'inoculo il peso dei topi è stato seguito quotidianamente per 40 giorni. Dal grafico (Fig. 11B) risulta evidente che non sono presenti differenze significative fra i gruppi in esame, in quanto aumentano di peso in maniera simile al controllo (Fig. 11A).

La Fig. 11 C riporta l'andamento del peso di topi SCID inoculati solo con cellule $CD4^+CD45RB^{high}$. Si può notare come nei primi 15 giorni dopo l'inoculo, vi sia un sostanziale aumento del peso, al quale consegue un drastico abbassamento. Uno dei sintomi della colite è la repentina perdita di peso. Questo risultato ci suggerisce che la mancanza delle cellule Treg procura la colite. Dato confermato dall'analisi istologica (colorazione ematossilina ed eosina) delle sezioni di colon prelevati dai topi SCID inoculati con cellule $CD4^+CD45RB^{high}$ (Fig 12 B). Rispetto ai colon dei topi di controllo (Fig. 12 B) questi presentano gravi ulcerazioni della mucosa un espanso infiltrato linfocitario anche nella sottomucosa, perdita della struttura funzionale (i villi intestinali non sono più evidenti) e delle cellule caliciformi, con un valore di colite score pari a 3.

Questi risultati mostrano come le cellule Treg controllino l'espansione dei linfociti Th e qualora le cellule Treg vengano a mancare o perdano la loro funzionalità si incorre nello sviluppo di gravi patologie autoimmuni quali la colite ulcerosa.

11. TOPI SCID INOCULATI CON CELLULE $CD4^+CD25^+CD45RB^{high}$ $IL-4R\alpha^{-/-}$ MOSTRANO SINTOMI DELLA COLITE PIU' ACCENTUATI RISPETTO AI TOPI INOCULATI CON CELLULE $CD4^+CD25^+CD45RB^{high}$ $IL-4R\alpha^{+/+}$.

Dopo avere ottenuto una conferma che le cellule $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ Treg svolgono un ruolo protettivo nello sviluppo della colite di origine autoimmune, si è analizzato il ruolo di IL-4 nella patogenesi di questa malattia.

A tale scopo topi $Rag2^{-/-}$ sono stati ripopolati con cellule $CD4^+CD25^+CD45RB^{high}$ isolate da topi $IL-4R\alpha^{+/+}$ (wt) oppure $IL-4R\alpha^{-/-}$ (ko). L'andamento del peso corporeo degli animali è stato monitorato per 32 giorni (Fig13). I due gruppi sperimentali mostrano un andamento del peso simile con la tendenza a decrescere con il passare del tempo supportando l'evidenza discussa in precedenza. Pur diminuendo nel peso wt diminuisce più repentinamente e in maniera più drammatica rispetto al gruppo inoculato con le cellule ko suggerendo un decorso della patologia peggiore.

Anche l'analisi istologica dei colon conferma questo dato (Fig 14 A e B) secondo il colite score i topi inoculati con cellule wt hanno un punteggio di 4 maggiore rispetto ai topi inoculati con le cellule ko che hanno un punteggio di 3.

Si può così concludere che le cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ $IL-4R\alpha^{-/-}$ che non possono rispondere alla citochina IL-4 inducono la colite ulcerosa di origine autoimmune ma con un quadro clinico meno drammatico rispetto alle cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ $IL-4R\alpha^{+/+}$

12. ANALISI DEL DECORSO DELLA COLITE ULCEROSA CON BASE AUTOIMMUNE IN TOPI SCID INOCULATI CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{HIGH} IL-4Rα^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{HIGH} IL-4Rα^{+/+}.

Per approfondire il risultato precedente topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con le diverse combinazioni cellulari proposte già dalla matrice utilizzata per gli esperimenti in vitro. Sono stati creati 4 gruppi sperimentali:

1. Inoculo con CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+}

2. Inoculo con CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+} + CD4⁺CD25⁻CD45RB^{low} IL-4Ra^{-/-}

3. Inoculo con CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-}

4. Inoculo con CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} + CD4⁺CD25⁻CD45RB^{low} IL-4Ra^{+/+}

Dopo circa 40 giorni dall'inoculo, i topi dei gruppi 1 e 3 hanno sviluppato la colite a differenza dei topi con le Treg sia wt che ko. Dopo circa 50 giorni i topi dei gruppi suddetti muoiono, mentre i topi appartenenti ai gruppi sperimentali 2 e 4 rimangono in vita con un peso stabile (Fig. 15) Tuttavia si osserva una maggiore mortalità di topi nel gruppo inoculato con la cellula CD4⁺ CD45RB^{high} wt rispetto ai ko.

13. ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA PRODUZIONE DI IL-2 IN CELLULE ISOLATE DA LINFONODI MESENTERICI, DALLA LAMINA PROPRIA E DALLA MILZA DI TOPI SCID INOCULATI CON CELLULE $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ IL-4R $\alpha^{-/-}$ O CON CELLULE $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ IL-4R $\alpha^{+/+}$.

Per analizzare in maggior dettaglio l'attivazione e la proliferazione delle cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ Th sia IL-4R $\alpha^{-/-}$ che IL-4R $\alpha^{+/+}$ è stato ripetuto l'esperimento precedente, e dopo 40 giorni i topi sono stati sacrificati e sono state purificate cellule dalla milza, dal linfonodo mesenterico e dalla lamina propria del colon sono state messe in coltura con gli stimoli anti-CD3 e anti-CD28 e dopo tre giorni è stata valutata la proliferazione con la timidina triziata e la produzione di IL-2 mediante saggio ELISA.

Milza. In tutti i gruppi gli splenociti sembrano proliferare in maniera omogenea molto poco rispetto al medium dopo 24h (Fig.16A) maggiore differenza si osserva dopo 48h (Fig. 16 B). Poiché non si sono riscontrate rilevanti differenze fra i diversi gruppi sia quelli senza Treg (G1 e G3) che quelli con le Treg (G2 e G4) possiamo dedurre che la milza non è un organo particolarmente interessato in questa patologia.

Linfonodo Mesenterico e Lamina Propria. Ciò che si osserva nel linfonodo mesenterico (Fig 17) e nella lamina propria (Fig 18) è che i gruppi inoculati solo con le cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{high}$ Th sia IL-4R $\alpha^{-/-}$ che IL-4R $\alpha^{+/+}$ (barra nera e grigio scuro) proliferano in maniera più accentuata rispetto ai gruppi inoculati anche con le cellule $CD4^+CD25^-CD45RB^{low}$ Treg IL-4R $\alpha^{-/-}$ o IL-4R $\alpha^{+/+}$ (barra bianca e grigio chiaro) (Fig. 17 e 18 A). Il medesimo andamento si riscontra nella produzione di IL-2 (Fig. 17 e 18 B).

Da queste evidenze possiamo concludere che la risposta autoimmune si attiva negli organi vicini e per questo interessati dalla colite ulcerosa autoimmune e i linfociti Th si attivano proliferando e producendo IL-2 in risposta all'infiammazione.

Qualora nei topi vengano inoculate cellule Treg la patologia non si sviluppa non si osserva infiammazione e le cellule non proliferano e non si attivano.

14. DELLA PRODUZIONE DI IFN γ IN CELLULE ISOLATE DA LINFONODI MESENERICI, DALLA LAMINA PROPRIA E DALLA MILZA DI TOPI SCID INOCULATI CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4R α ^{+/+}.

Dopo aver osservato la proliferazione e la produzione di IL-2 nei gruppi di topi dell'esperimento precedente abbiamo rilevato anche la quantità di IFN γ presente nel spranante delle colture di cellule di linfonodo mesenterico e della lamina propria dei diversi gruppi.

Ciò che si osserva è che solo i gruppi inoculati con le cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} Th sia IL-4R α ^{-/-} che IL-4R α ^{+/+} producono IFN γ ma salta subito agli occhi che in entrambi sia nel linfonodo mesenterico (Fig 19A) sia la lamina propria (Fig 19B) le cellule IL-4R α ^{-/-} ne producono una quantità maggiore.

La conclusione a cui si è giunti è la seguente: Poiché IL-4 è una citochina di tipo Th2 ovvero è prodotta da linfociti Th2 e per feedback induce il fenotipo Th2. Non possedendo il recettore per IL-4 i topi IL-4R α ^{-/-} non sono sensibili a tale citochina così che tutte le loro cellule Th quando si attivano polarizzano verso il fenotipo Th1 producendo un gran quantità di IFN γ superiore ai topi wt.

CONCLUSIONE E APPROCCIO FUTURO

IL-17 è una citochina proinfiammatoria. Nei tessuti infiammati esiste un numero elevato di cellule Th17, tanto che gli ultimi studi condotti su queste cellule dimostrano che IL-17 è una delle maggiori citochine responsabili del danno tissutale dovuto all'infiammazione. Esiste un fine equilibrio fra cellule Th1, Th2 e Th17. E' stato infatti dimostrato che $IFN\gamma$ non solo induce una polarizzazione a Th1 ma inibisce la polarizzazione dei linfociti a Th17 inibendo la produzione di IL-17.

In questo lavoro si dimostra che topi $IL-4R\alpha^{-/-}$ che non sono capaci di rispondere alla citochina IL-4 poiché mancanti della catena di attivazione del recettore per la medesima citochina inoculati con cellule $CD4^{+}CD25^{-}CD45RB^{high}$ Th senza le cellule $CD4^{+}CD25^{+}CD45RB^{low}$ sviluppano la colite di origine autoimmune ma in maniera meno grave rispetto a topi wt trattati nello stesso modo.

Una possibile spiegazione e l'obiettivo proposto risiede nel fatto che i topi $IL-4R\alpha^{-/-}$ producono una gran quantità di $IFN\gamma$ proprio perché non rispondono a IL-4. $IFN\gamma$ a sua volta inibisce la polarizzazione dei linfociti a cellule Th17, le quali producendo IL-17 inducono una forte infiammazione tissutale.

FIGURA 1

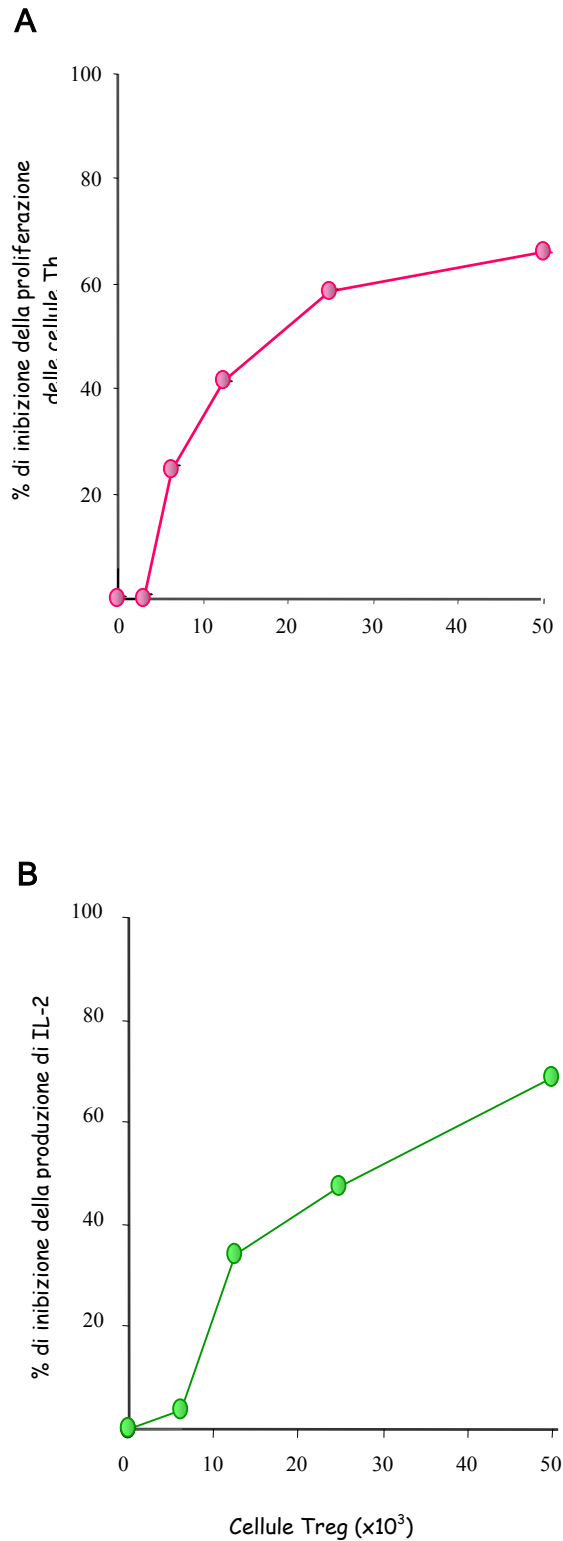
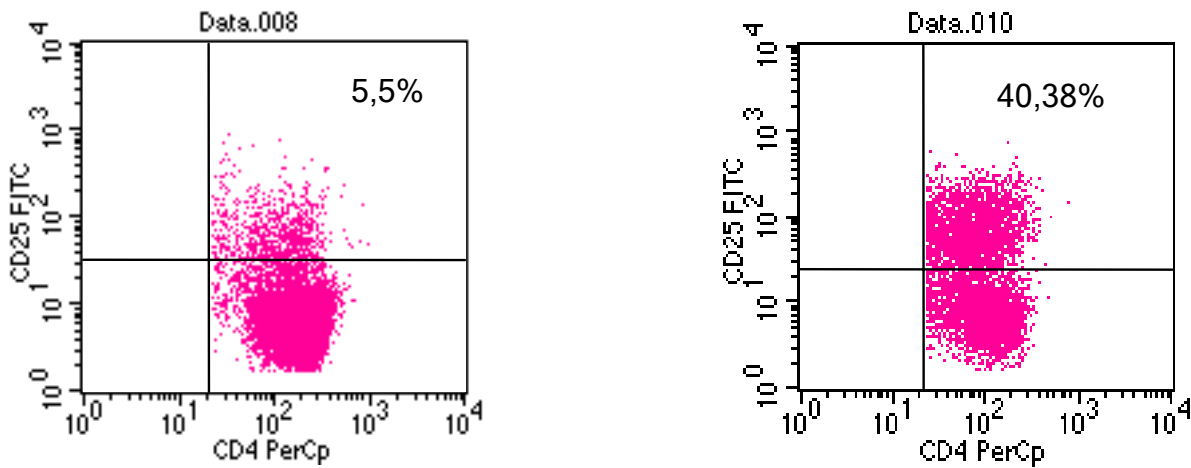


Figura 1 Le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sopprimono l'attivazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state messe in cocoltura in triplicato per 3 giorni con APC in presenza di numeri crescenti di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. A, analisi della proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th mediante incorporazione di [³H]TdR osservata dopo 3 giorni di coltura. La risposta proliferativa delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th alla soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg è espressa come percentuale di inibizione della proliferazione cellulare. B, La produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th nel saggio di soppressione è stata misurata mediante ELISA. La produzione di IL-2 è espressa come percentuale di inibizione.

FIGURA 2

A



B

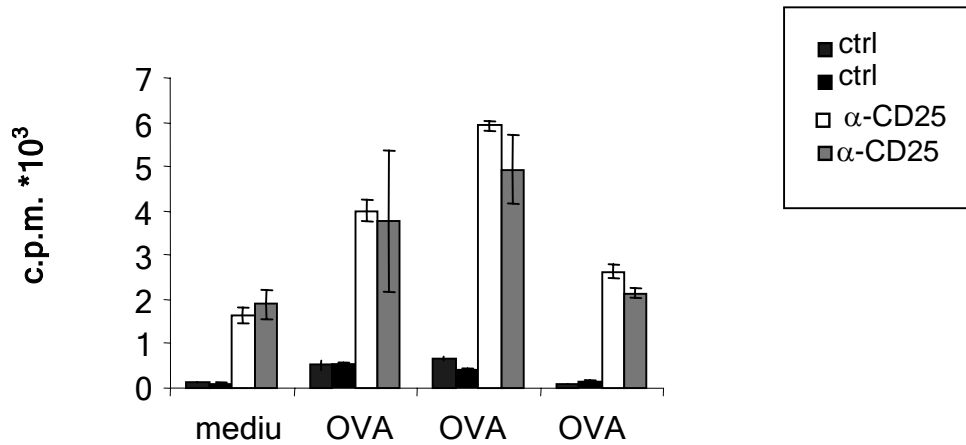


Figura 2 CD25 GIOCA UN RUOLO FONDAMENTALE NELLA SOPPRESSIONE MEDIATA DALLE CELLULE CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T REGOLATORIE.

Un anti-CD25 puificato da un ibridoma o un controllo isotipico sono stati inoculati per via intraperitoneale in topi C57/bl6 dopo 3gg i medesimi topi sono stati immunizzati con l'antigene ovalbumina (OVA323) in diverse concentrazioni:1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml con l'adiuvante IFA.

Dopo il sacrificio da tutti i gruppi sperimentali sono state purificate le cellule Th e le cellule Treg del linfonodo inguinale messe in coltura con APC mitomicinate e lo stimolo policlonale aCD3 dopo tre giorni è stata aggiunta la timidina triziata. La proliferazione è espressa in c.p.m.± S.E

FIGURA 3

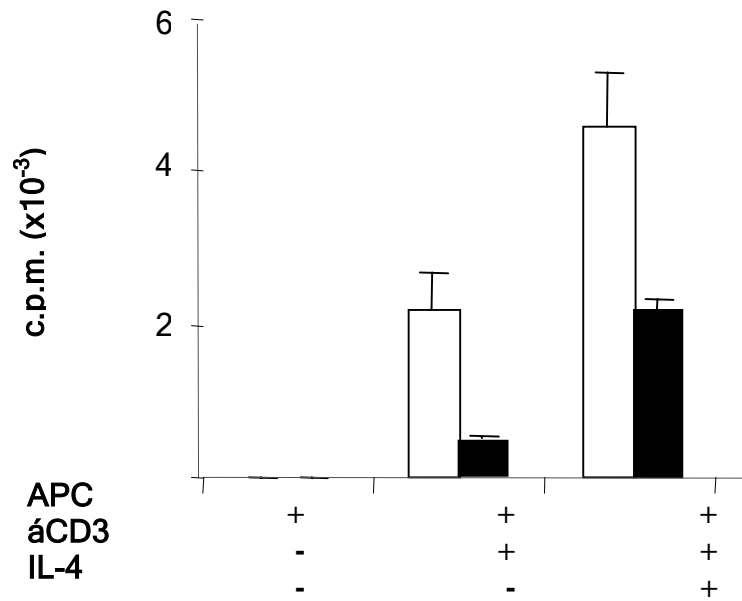


Figura 3. IL-4 promuove la proliferazione delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th e delle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg. Cellule CD4⁺ CD25⁻ Th (barra bianca) e cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg (barra nera) sono state messe in coltura con APC in triplicato, stimulate con áCD3 mAb in presenza o in assenza di IL-4. La proliferazione cellulare è misurata mediante incorporazione di [³H]TdR osservata dopo 3 giorni di coltura. La risposta proliferativa delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th e delle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg è espressa come numero dei c.p.m. ± S.E.

FIGURA 4

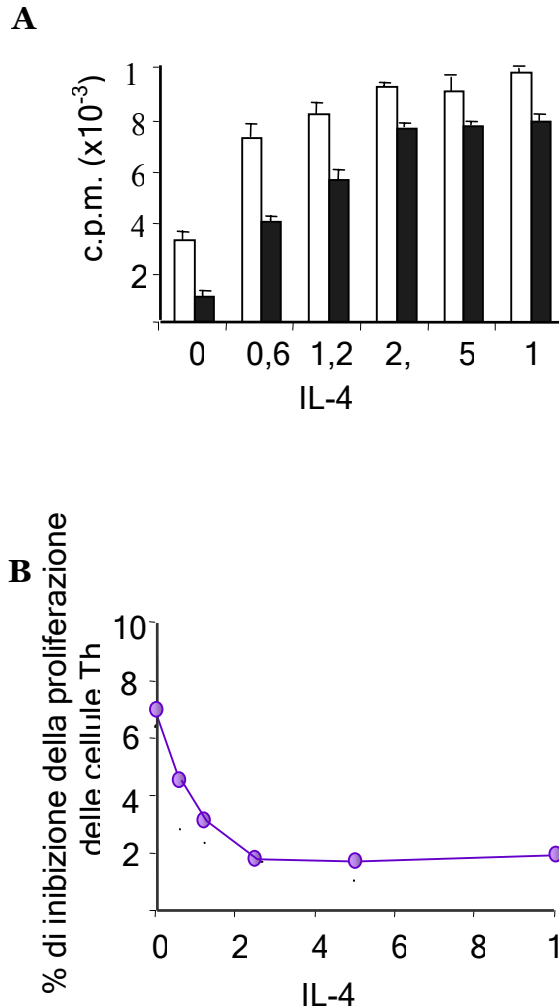


Figura 4 IL-4 inibisce la soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. **A**, cellule CD4⁺CD25⁻ Th (barra bianca) o cellule CD4⁺CD25⁻ Th + cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (barra nera), mescolate in ugual numero sono state messe in coltura in presenza di APC e stimulate per 3 giorni con anti-CD3 mAb e con IL-4 alle concentrazioni indicate. La proliferazione cellulare è stata determinata mediante incorporazione di [³H]TdR. **B**, La risposta proliferativa delle cellule CD4⁺CD25⁺ Th alla soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza di APC è espressa come percentuale di inibizione della proliferazione in rapporto ai valori osservati in assenza di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

FIGURA 5

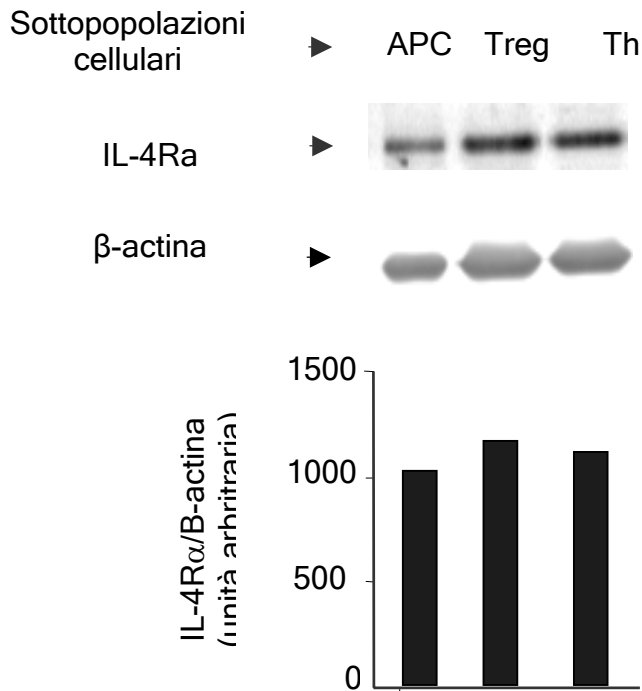


Figura 5. La catena IL-4R α è espressa da APC, cellule CD4⁺CD425⁻ Th e cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. APC, cellule CD4⁺CD425⁻ Th e cellule CD4⁺CD25⁺ Treg purificate sono state lisate, e le proteine ottenute sono state separate mediante SDS-PAGE. L'espressione della catena recettoriale IL-4R α è stata osservata mediante WB.

FIGURA 6

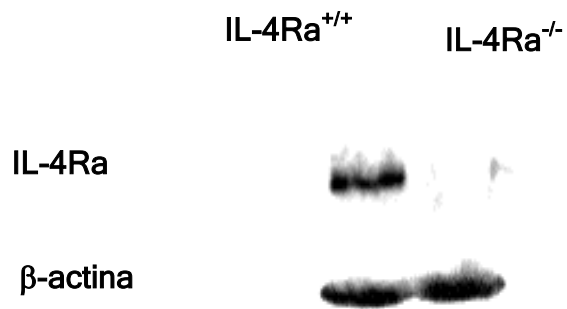
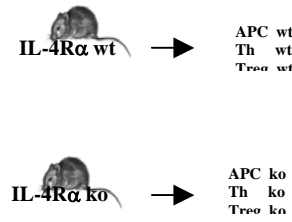


Figura 6, Analisi dell'espressione di IL-4Rα in topi *wild type* (IL-4Rα^{+/+}) e in topi *knock out* (IL-4Rα^{-/-}) . Splenociti sono stati isolati e lisati, e le proteine ottenute sono state separate mediante SDS-PAGE. L'espressione della catena recettoriale IL-4Rα è stata osservata mediante W.B.

A

FIGURA



		αCD3							
APC	wt	wt	wt	wt	wt	ko	ko	ko	ko
Th	wt	wt	ko	ko	wt	wt	ko	ko	
Treg	wt	ko	wt	ko	wt	ko	wt	ko	

		αCD3 + IL-4							
APC	wt	wt	wt	wt	ko	ko	ko	ko	
Th	wt	wt	ko	ko	wt	wt	ko	ko	
Treg	wt	ko	wt	ko	wt	ko	wt	ko	

B

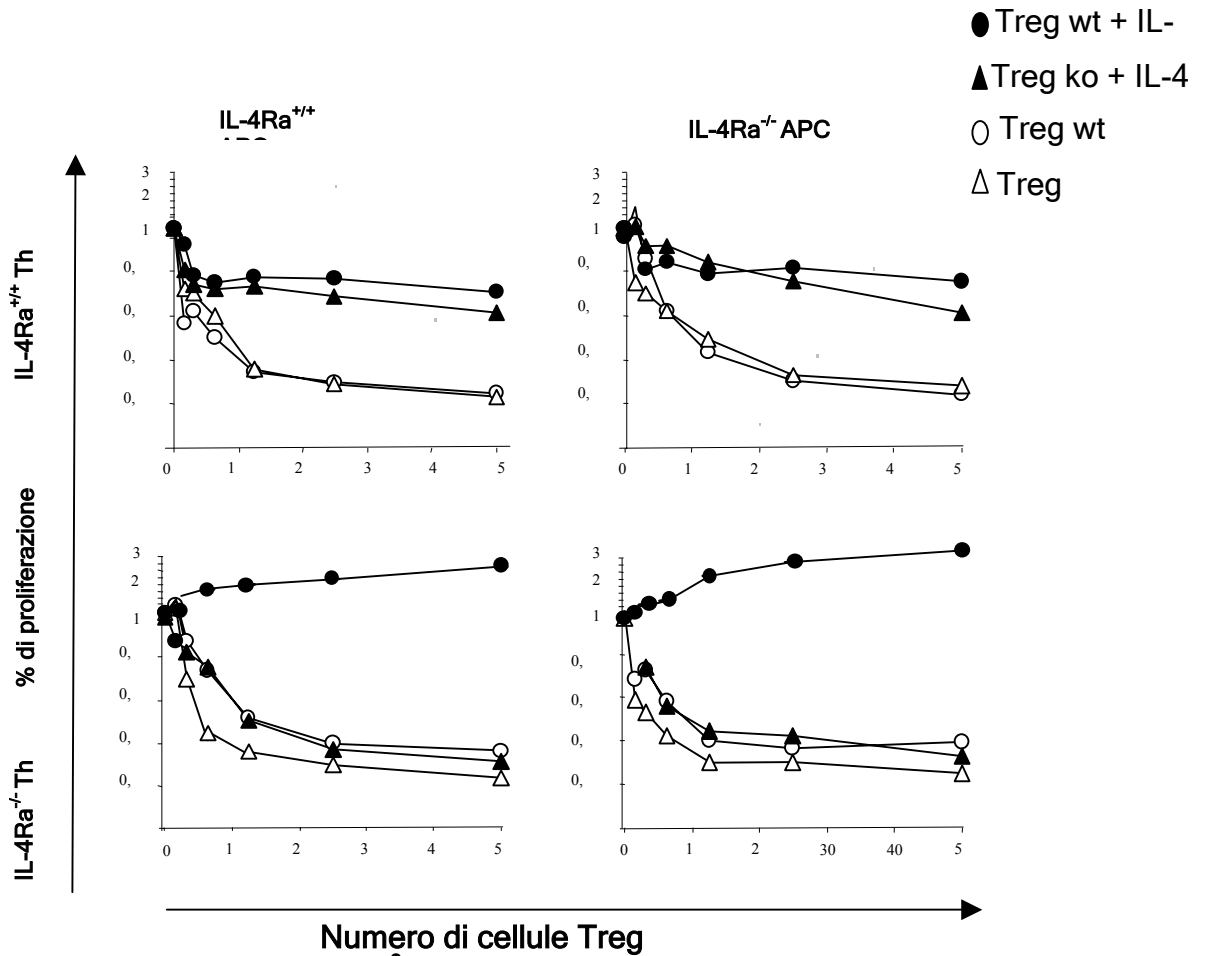


Figura 7. L'espressione della catena IL-4Rα protegge le cellule CD4⁺CD25⁻ Th dalla soppressione. A, Matrice di 8 combinazioni di cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4Rα^{+/+} o IL-4Rα^{-/-} e di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4Rα^{+/+} o IL-4Rα^{-/-} in presenza degli stimoli α-CD3 mAb o α-CD3 mAb+IL-4. Cellule CD4⁺CD25⁻ Th IL-4Rα^{+/+} (riquadro in alto) o IL-4Rα^{-/-} (riquadro in basso) sono state messe in co-coltura in triplicato in presenza di APC IL-4Rα^{+/+} (riquadro a sinistra) o di APC IL-4Rα^{-/-} (riquadro a destra), in assenza (simboli vuoti) o in presenza di IL-4 (simboli pieni). Sono stati aggiunti alla co-coltura i numeri indicati di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg IL-4Rα^{+/+} (cerchio) o IL-4Rα^{-/-} (triangolo). L'incorporazione di [³H]TdRè stata analizzata al terzo giorno di coltura. I livelli di proliferazione sono stati misurati come c.p.m. ± SE, sono espressi come percentuale di inibizione della proliferazione.

FIGURA 8

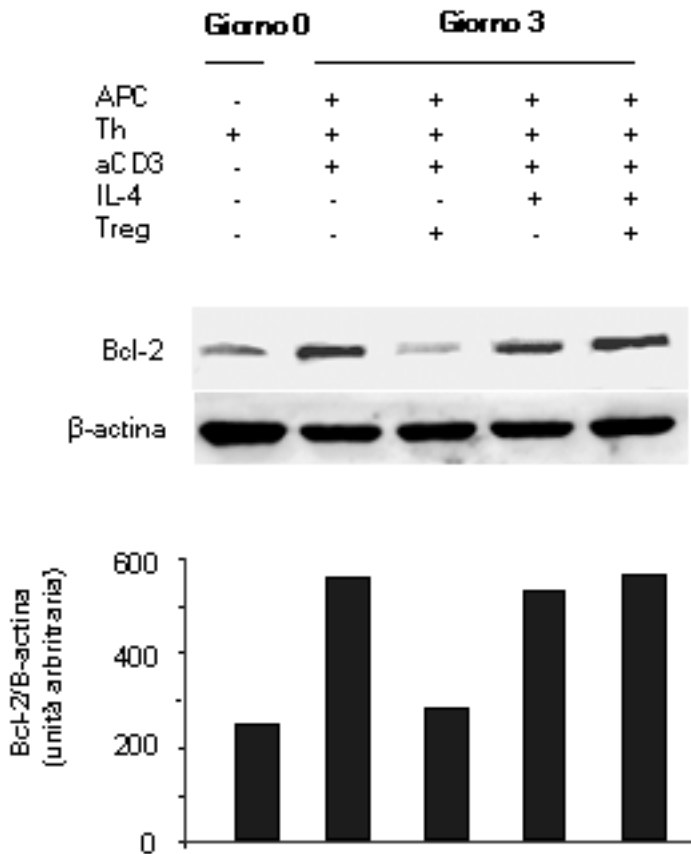


Figura 8. IL-4 previene l'inibizione di Bcl-2 nelle cellule CD4⁺CD25⁻ Th messe in co-coltura con cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state messe in coltura sia da sole sia con cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in ugual numero in presenza di APC, anti-CD3 mAb con o senza IL-4 per 3 giorni, in seguito le cellule sono state separate mediante FACS in base alla marcatura con CFSE. Cellule CD4⁺CD25⁻ Th purificate sono state utilizzate come controllo. Dopo la separazione le cellule sono state lisate e le proteine estratte sono state separate mediante SDS-PAGE. L'espressione di Bcl-2 è stata osservata mediante WB.

FIGURA 9

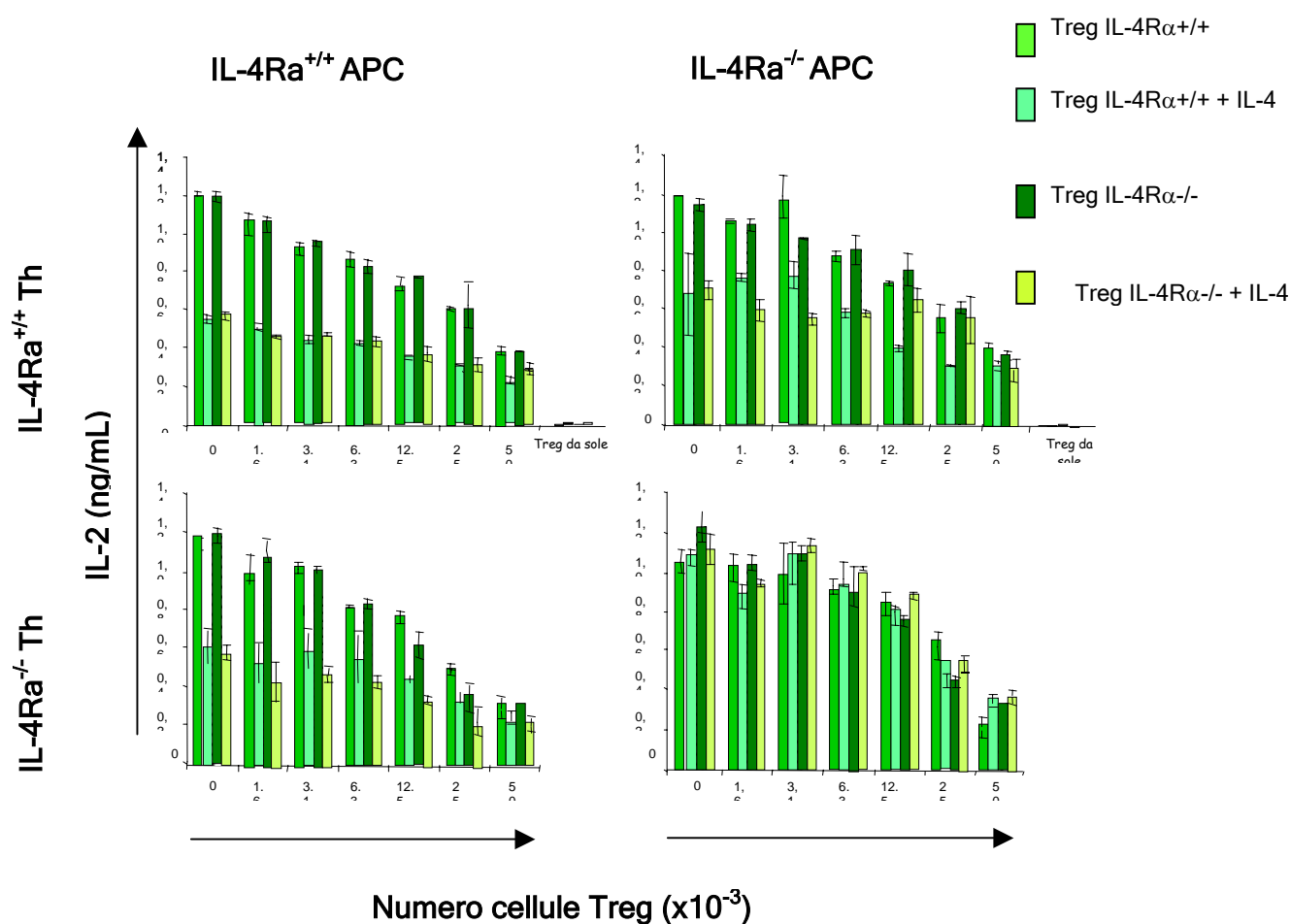


Figura 9 LE CD4⁺CD25⁺ TREG INIBISCONO LA PRODUZIONE DI IL-2 DA PARTE DELLE CD4⁺CD25⁻ TH IN PRESENZA DI IL-4. La produzione di IL-2 è stata misurata dai sopranatanti provenienti dalla coltura descritta in figura 7. Le cellule IL-4Ra^{+/+} (riquadro in alto) e IL-4Ra^{-/-} CD4⁺CD25⁻ Th (riquadro in basso), sono state incubate per tre giorni con anti-CD3 mAb in presenza di IL-4Ra^{+/+} APC (pannello a destra) o di IL-4Ra^{-/-} APC (riquadro a sinistra). La presenza delle Treg IL-4Ra^{+/+} o IL-4Ra^{-/-} e la presenza o assenza di IL-4 è indicata nella legenda.

Figura

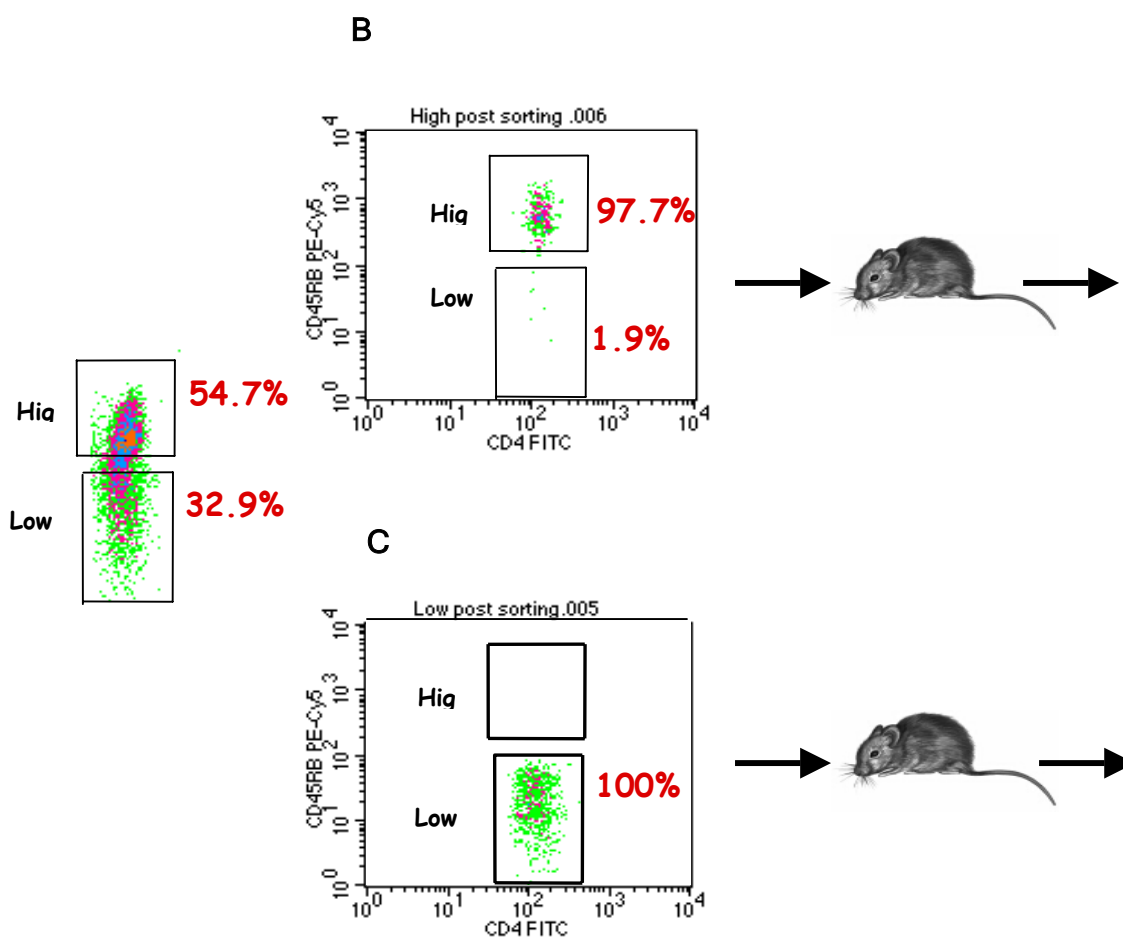


Figura 10. Separazione delle cellule $CD4^+CD45RB^{high}$ (B) e $CD4^+CD45RB^{low}$ (C) da splenociti totali(A), mediante sorting cellulare.

Figura 11

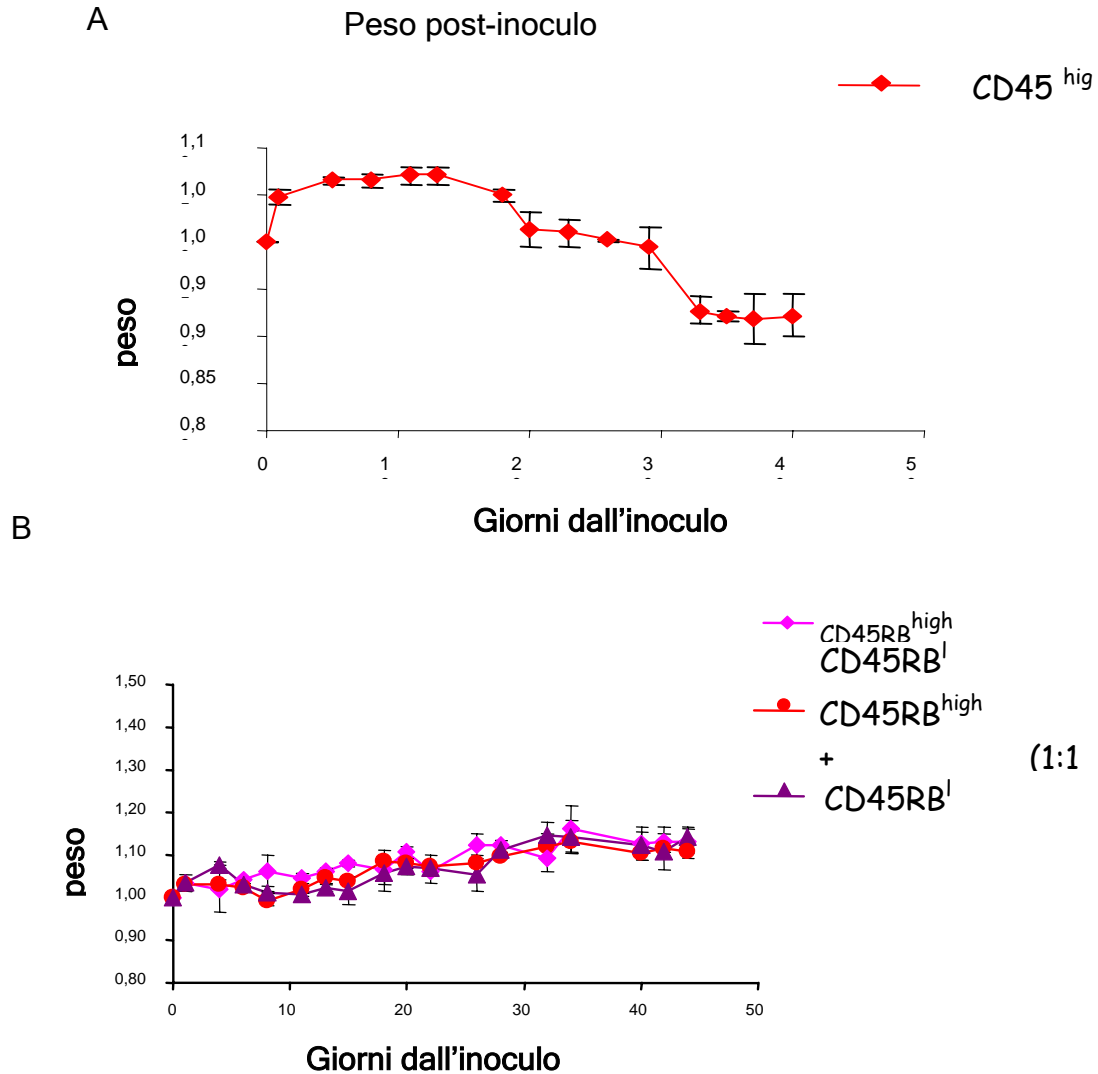


Figura 11. Cellule CD4⁺CD45RB^{low} Treg proteggono i topi dallo sviluppo dell'autoimmunità.

Topi Rag2^{-/-}. Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD45RB^{high}. L'andamento del peso corporeo è stato osservato per 40gg (A).

Topi Rag2^{-/-} sono stati divisi in tre gruppi sperimentali. I tre gruppi sperimentali sono stati inoculati con cellule purificate da topi IL-4Ra^{+/+}. Il primo gruppo ha ricevuto cellule CD4⁺CD45RB^{high} più il 10% di cellule CD4⁺CD45RB^{low} (curva rosa); il secondo gruppo, cellule CD4⁺CD45RB^{high} e cellule CD4⁺CD45RB^{low} in un rapporto di 1:1 (curva rossa); il terzo gruppo ha ricevuto solo cellule CD4⁺CD45RB^{low} (curva viola).

L'andamento del peso corporeo è stato seguito per 40gg (A); Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD45RB^{high}, l'andamento del peso corporeo è stato osservato per 40gg (B).

FIGURA 12

A



B

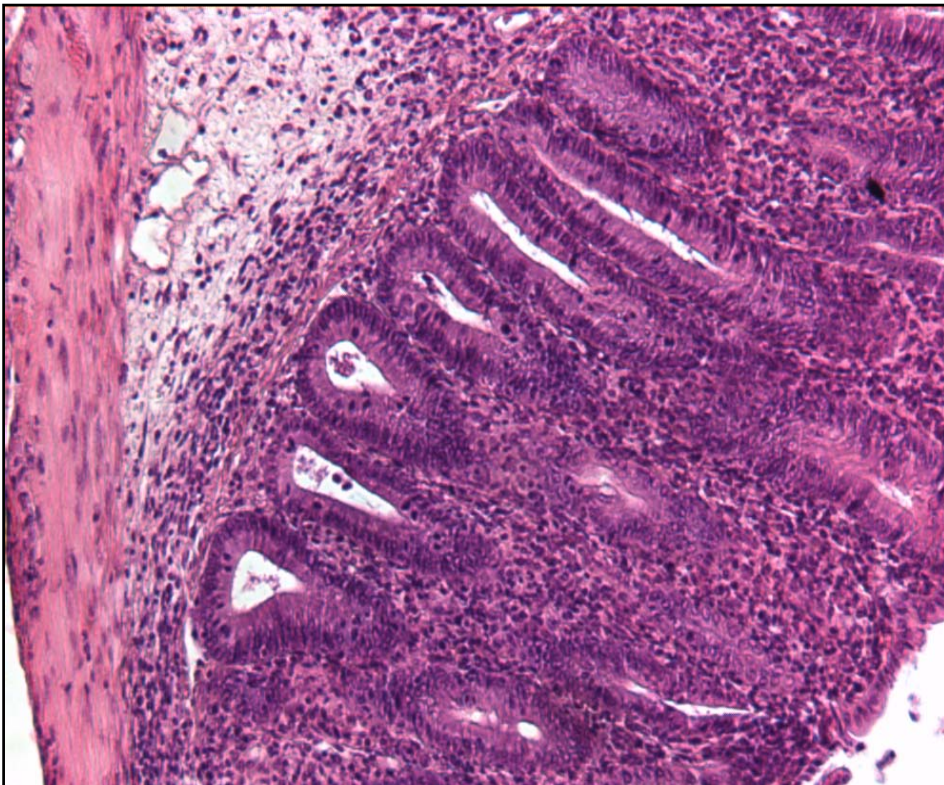


Figura 12 . Cellule T CD4⁺ CD45RB^{high} promuovono lo sviluppo della colite autoimmune.
Sezioni istologiche di colon da topi *wild type* (A) e RAG2^{-/-} con cellule CD4⁺CD45RB^{high} (B).
Colorazioni ematossilina ed eosina.

FIGURA 13

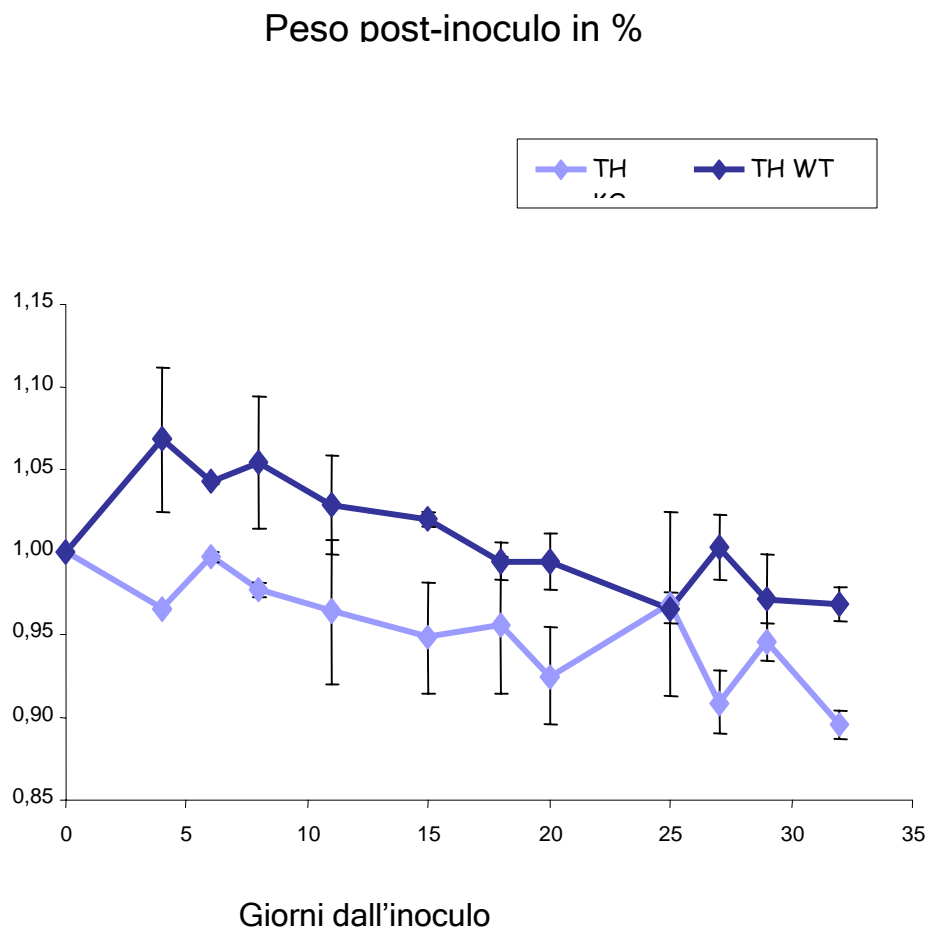


Figura 13. Ruolo delle cellule $CD4^+CD45RB^{high}$ provenienti da animali $IL-4R\alpha^{+/+}$ e $IL-4R\alpha^{-/-}$ nell'induzione della colite autoimmune. Topi $Rag2^{-/-}$ sono stati inoculati con Cellule $CD4^+CD45RB^{high}$ $IL-4R\alpha^{+/+}$ (blu chiaro) o $IL-4R\alpha^{-/-}$ (blu scuro).L'andamento del peso è stato monitorato per 32 gg.

FIGURA 14

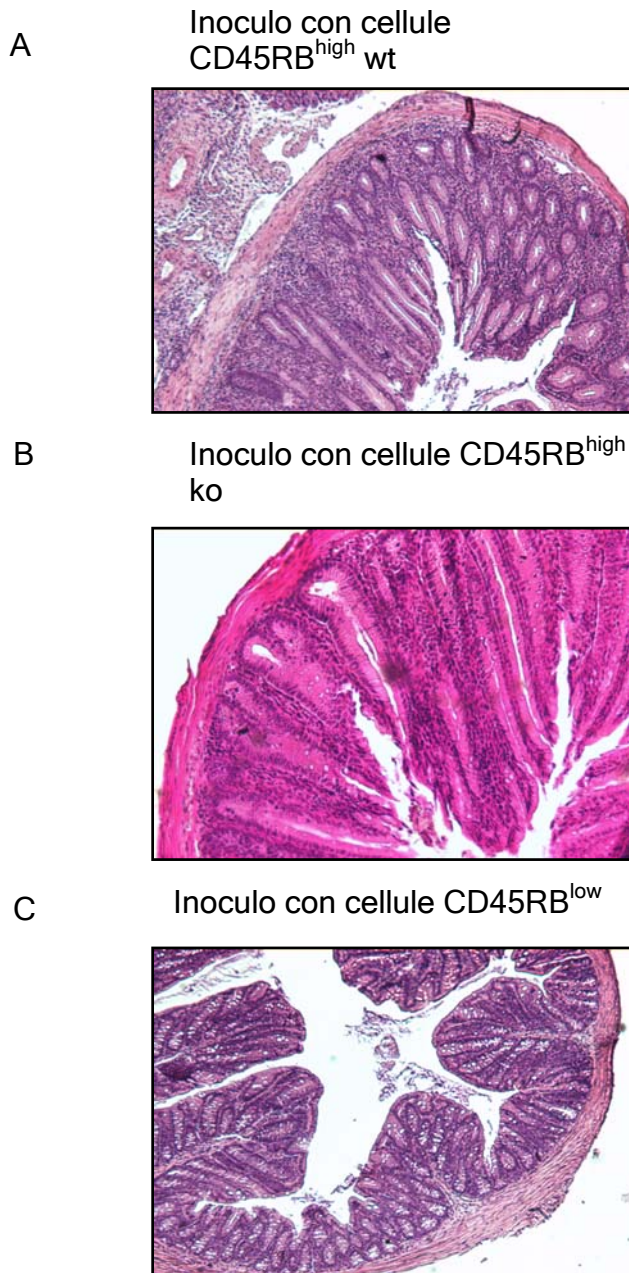


Figura 14. Ruolo delle cellule CD4⁺CD45RB^{high} provenienti da animali IL-4Ra^{+/+} e IL-4Ra^{-/-} nell'induzione della colite autoimmune Sezioni istologiche di colon di topi SCID inculati con cellule CD4⁺CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+} (A) o IL-4Ra^{-/-} (B) oppure con cellule CD4⁺CD45RB^{low} IL-4Ra^{+/+} (C). Colorazione con ematossilina ed eosina.

FIGURA 15

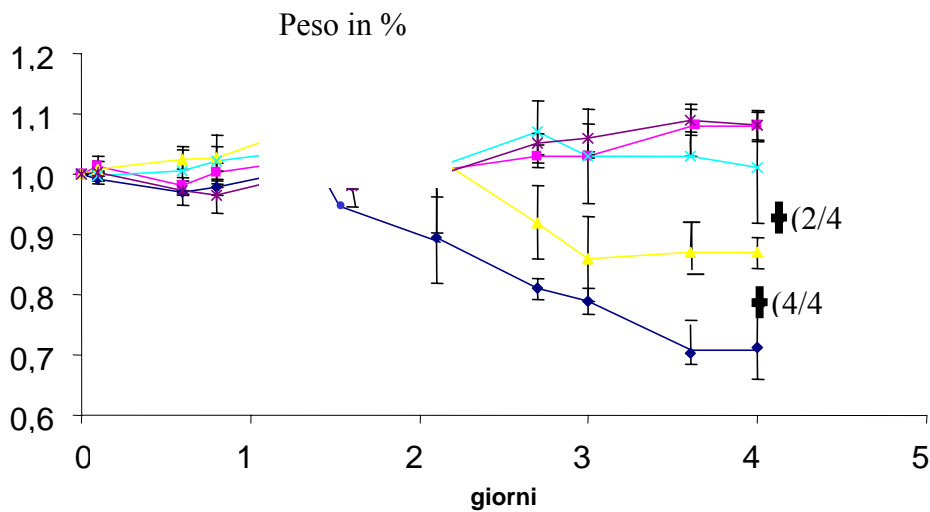


Figura 15. Ruolo delle cellule CD4⁺CD45RB^{high} provenienti da animali IL-4Rα^{+/+} e

IL-4Rα^{-/-} nell'induzione della colite autoimmune. Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con

Cellule CD4⁺CD45RB^{high} IL-4Rα^{+/+} (curva blu) o IL-4Rα^{-/-} (curva gialla)

oppure con cellule CD4⁺CD45RB^{high} IL-4Rα^{+/+} Th + cellule CD4⁺CD45RB^{low} IL-4Rα^{-/-} Treg (curva rosa) o cellule CD4⁺CD45RB^{high} IL-4Rα^{-/-} Th + cellule CD4⁺CD45RB^{low} IL-4Rα^{+/+} Treg (curva celeste) o con cellule CD4⁺CD45RB^{high} IL-4Rα^{+/+} Th + cellule CD4⁺CD45RB^{low} IL-4Rα^{+/+} Treg (curva viola).

L'andamento del peso è stato per 40 gg.

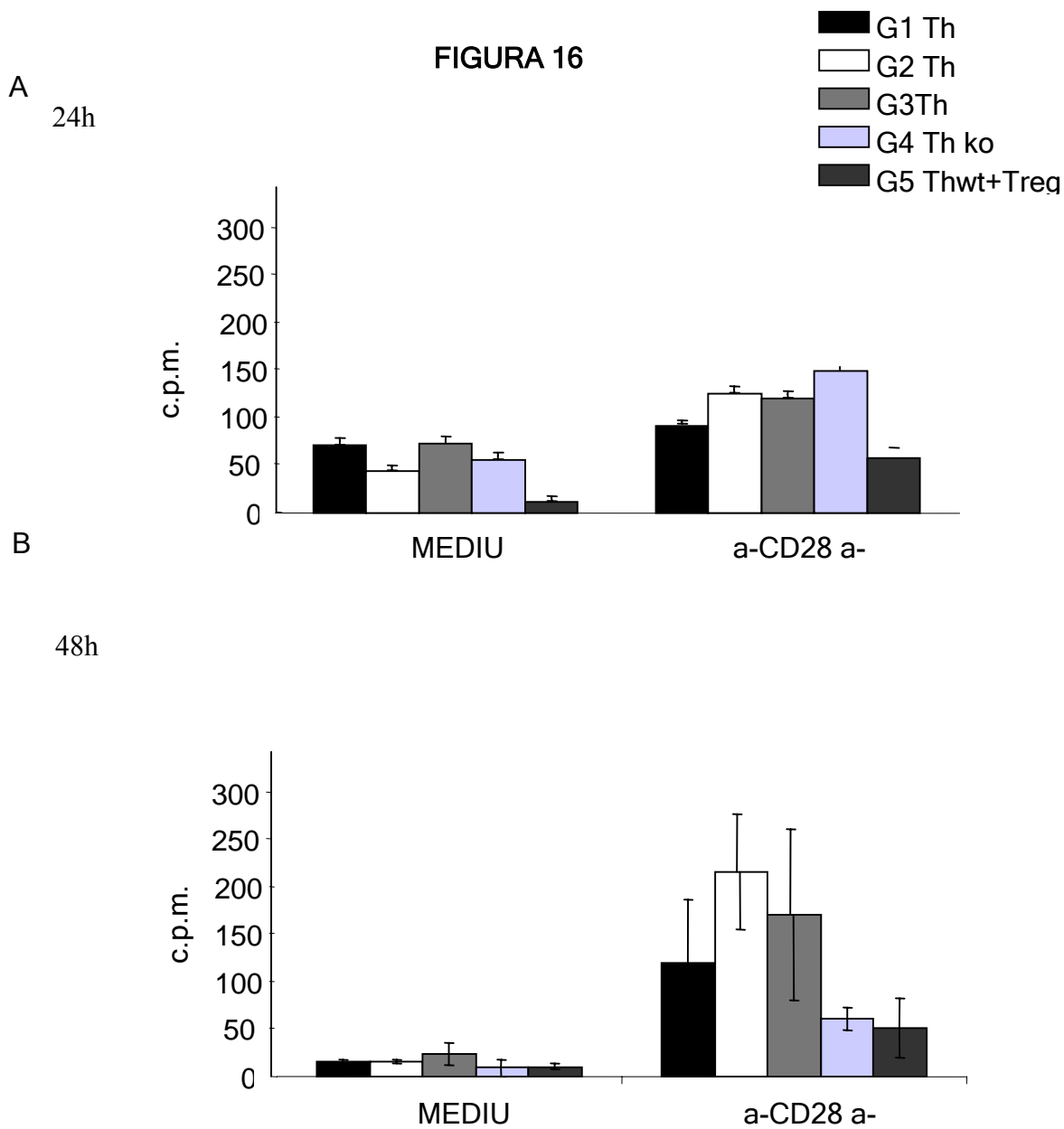


Figura 16. ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA PRODUZIONE DI IL-2 IN CELLULE ISOLATE DALLA MILZA DI TOPI RAG2^{-/-} INOCULATI CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+}. Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} o IL-4Ra^{+/+} dopo circa 40 gg sono stati purificati gli splenociti e valutata la proliferazione mediante incorporazione timidina triziata. La proliferazione è espressa in c.p.m.± S.E

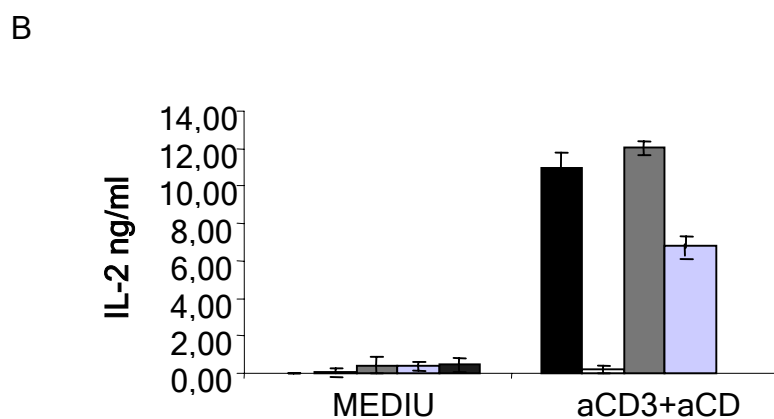
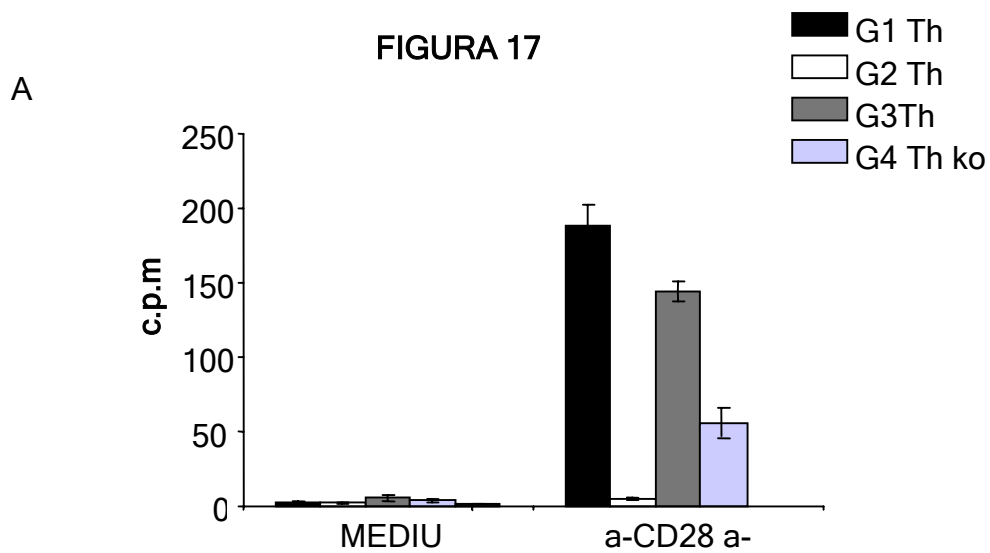


Figura 17. ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA PRODUZIONE DI IL-2 IN CELLULE ISOLATE DAL LINFONODO MESENTERICO DI TOPI RAG2^{-/-} INOCULATI CON CELLULE

CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+}.

Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} o IL-4Ra^{+/+} dopo circa 40 gg sono state purificate e valutata la proliferazione mediante incorporazione timidina triziata. La proliferazione è espressa in c.p.m. ± S.E. E' stata inoltre valutata la produzione di IL-2 mediante saggio ELISA

Condotta sui soprannatanti della coltura cellulare.

FIGURA 18

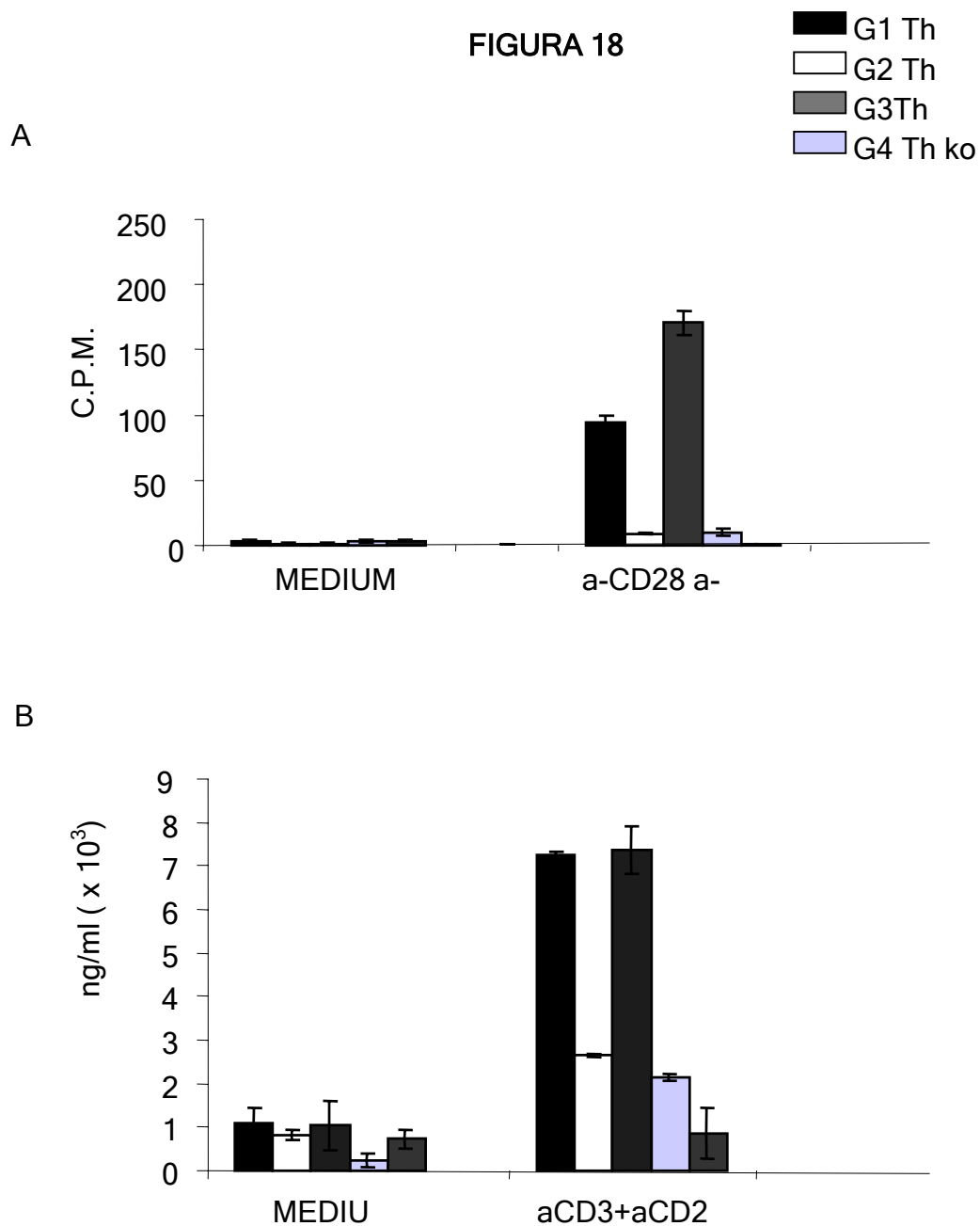


Figura 18. ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA PRODUZIONE DI IL-2 IN CELLULE ISOLATE DALLA LAMINA PRORPIA DI TOPI RAG2^{-/-} INOCULATI CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+}.

Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} o IL-4Ra^{+/+} dopo circa 40 gg sono state purificate e valutata la proliferazione mediante incorporazione timidina triziata. La proliferazione è espressa in c.p.m.± S.E. E' stata inoltre valutata la produzione di IL-2 mediante saggio ELISA Condotta sui sopranatanti della coltura cellulare.

FIGURA 19

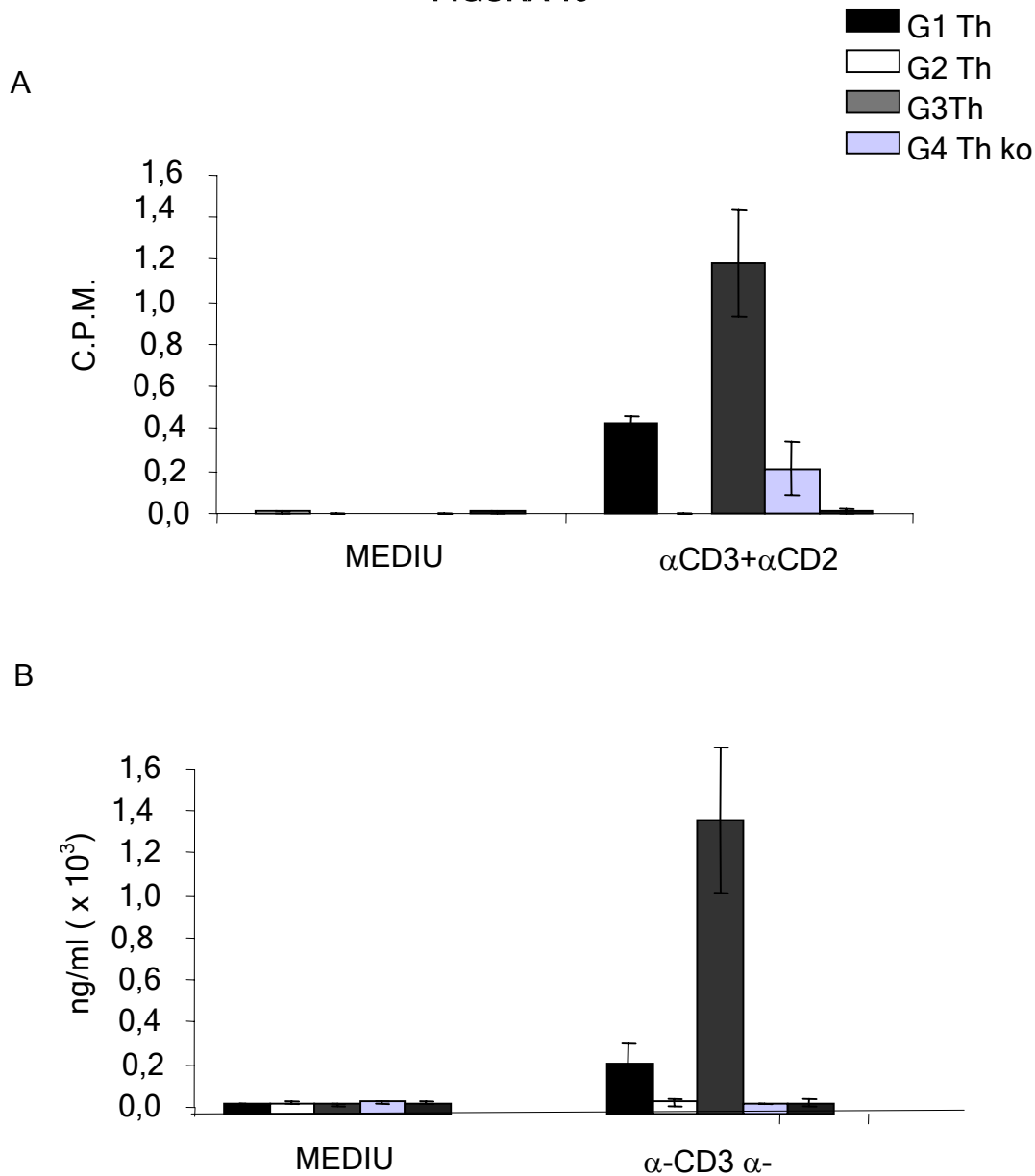


Figura 19. ANALISI DELLA DELLA PRODUZIONE DI IFN- γ IN CELLULE ISOLATE DALLA LAMINA

PRORPIA E DALINFONODO MESENERICODI TOPI RAG2^{-/-} INOCULATI CON CELLULE

CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} O CON CELLULE CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{+/+}.

Topi Rag2^{-/-} sono stati inoculati con cellule CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} IL-4Ra^{-/-} o IL-4Ra^{+/+} dopo circa 40 gg

sono state purificate messe in coltura con α CD3 pi \dot{u} α CD28 per 72 h.

La quantit \grave{a} di IFN γ \grave{e} stata valutata mediante saggio ELISA

DISCUSSIONE

Quale è l'importanza delle cellule Treg in patologie autoimmunitarie e come possono essere studiate per controllare la risposta immunitaria sia fisiologica che patologica?

Polimorfismi di diversi geni come *Ctla4*, *Il2*, *Cd25* contribuiscono significativamente alla suscettibilità genetica ai più comuni disordini autoimmuni. Mancanza di questi geni provocano nei topi gravi patologie autoimmunitarie presumibilmente attraverso un effetto sullo sviluppo e la funzione delle cellule $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg. Similmente il blocco di CTLA-4 oppure la neutralizzazione della citochina IL-2 provoca autoimmunità in topi *wild type*. E' quindi possibile che particolari polimorfismi di questi geni possano alterare lo sviluppo o la funzionalità delle cellule Treg.

In particolari condizioni le cellule Treg possiedono una più elevata proliferazione e attività metabolica delle altre cellule di conseguenza sono più suscettibili a radiazioni ionizzanti, droghe radiomimetiche (come la ciclofosfamide) e alla carenza di alcune vitamine come l'acido folico.

Sebbene la deplezione delle cellule Treg provoca disordini autoimmunitari, tuttavia la loro assenza può intensificare l'immunità contro i tumori. *In vivo* la risposta di cellule T attivate contro specifici antigeni tumorali viene notevolmente intensificata dalla deplezione delle cellule $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg. Inoltre è stato osservato che queste cellule sono abbondanti nel tumore così che queste possono agire impedendo l'immunosorveglianza e sopprimendo una potenziale risposta immunitaria autologa contro il tumore. Quindi le cellule $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg sono uno dei target preferiti nell'immunoterapia nei tumori.

A tal fine sono stati elaborate diverse strategie per ridurre il loro numero e la loro funzione come ad esempio la deplezione localizzata alla massa tumorale delle cellule $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg, attenuare la funzione delle cellule $CD4^+CD25^+$

Foxp3⁺Treg ad una vaccinazione con antigeni tumorali o espansione dei linfociti presenti negli infiltrati tumorali in seguito alla deplezione delle cellule Treg.

Similarmente ai tumori una deplezione o una riduzione delle cellule Treg potenzia la risposta immunitaria contro agenti patogeni. Le cellule Treg esplicano la loro funzione soppressoria dopo essersi espanse, studiando appunto queste capacità proliferative e soppressive si è pensato che lo sviluppo di protocolli per una ottimale espansione clonale di queste possa contribuire alla tolleranza ai trapianti. Inoltre cellule T *naive* possono essere reclutate nel sito del trapianto e indotte a differenziare in cellule Treg aumentando ancora di più la tolleranza. Questo stesso tipo di approccio può essere applicato anche in patologie autoimmuni come le allergie, le malattie infiammatorie e per la tolleranza madre/feto nel corso di una gravidanza.

Per raggiungere lo scopo di attenuare o intensificare la soppressione mediata dalle cellule Treg nei diversi quadri clinici, è necessario individuare specifici bersagli molecolari che possano presentare distinti effetti sulle cellule Treg e sulle cellule T effettrici. Nuovi target molecolari con effetti differenti sulle due popolazioni cellulari possono rappresentare una nuova generazione di agenti terapeutici che selettivamente sopprimono o incrementano la risposta immune attraverso il controllo dell'equilibrio tra cellule Treg e cellule T effettrici.

Partendo dai dati presentati si possono fare delle considerazioni sul ruolo che la citochina IL-4 svolge sul mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario. Le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, infatti, sono coinvolte nel mantenimento della tolleranza in quanto inibiscono la proliferazione dei linfociti CD4⁺CD25⁻ Th autoreattivi. Poiché IL-4 inibisce l'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg si può asserire che in particolari condizioni patologiche, questa citochina potrebbe favorire invece che inibire l'autoimmunità. Questa considerazione è sostenuta dalla osservazione che topi transgenici per IL-4 sviluppano alcune patologie autoimmuni come il *Lupus eritematosus sistemico* (SLE), la cui patogenesi è dovuta allo sviluppo da parte dell'organismo di anticorpi contro bersagli nucleari, oppure sviluppano anemia emolitica o nefrite autoimmune. Questi disordini possono essere spiegati dall'effetto protettivo di IL-4 sulla sopravvivenza e sulla proliferazione dei linfociti T autoreattivi. Una maggior

resistenza all'apoptosi è considerata oggi come una caratteristica emergente nella patogenesi del SLE. In alcuni pazienti affetti da SLE è stato, infatti, osservato, che i linfociti del sangue esprimono elevati livelli di Bcl-2 e sono resistenti all'apoptosi.

La risposta immunitaria è il risultato di un fine equilibrio tra componenti cellulari che promuovono la risposta contro l'antigene e componenti che la regolano. La cinetica di attivazione e il tempo di sopravvivenza dei linfociti determinano l'esito della risposta stessa. I risultati riportati in questo lavoro, chiarendo i vari effetti di IL-4 sulla sopravvivenza e sulla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg potrebbero contribuire a definire il ruolo di IL-4 nella tolleranza ai trapianti e nell'autoimmunità. L'osservazione che IL-4 può direttamente espandere la popolazione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg fa pensare ad un nuovo meccanismo di prevenzione dell'autoimmunità. Tuttavia IL-4 promuove anche l'espansione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th proteggendole dalla soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Pertanto IL-4 può avere effetti dannosi in particolari condizioni patologiche. Queste osservazioni portano a concludere che il sito e/o lo stadio della risposta immunitaria possono essere determinanti sull'effetto di IL-4: incrementare il numero di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg oppure proteggere le cellule CD4⁺CD25⁻ Th dalla soppressione mediata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

Partendo dai risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo cercato di studiare l'azione di IL-4 nella patogenesi della colite autoimmune. Il modello preso in esame è basato su una patologia autoimmune che affligge l'intestino crasso nello specifico il colon. La colite è promossa da batteri commensali verso i quali viene attuata una potente risposta cellulo-mediata di tipo Th1. I sintomi della colite autoimmune sono la perdita del peso corporeo associata ad una estesa distruzione della mucosa intestinale ad opera dei linfociti T autoreattivi. La colite può essere indotta in topi SCID, mediante inoculo della popolazione linfocitaria CD4⁺CD45RB^{high} Th. I danni indotti dalle cellule Th possono essere prevenuti con inoculo di cellule CD4⁺CD45RB^{low}. Questi dati evidenziano in vivo gli effetti inibitori esercitati dalle Treg. Nel presente lavoro abbiamo analizzato il ruolo di IL-4 nella patogenesi della colite autoimmune indotta in topi SCID in seguito all'inoculo di cellule Th IL-4Rα^{+/+} o IL-4Rα^{-/-}.

I nostri risultati dimostrano che in assenza del segnale promosso da IL-4, le cellule ko portano ad un miglioramento dei sintomi colitogenici rispetto alle cellule wt in termini di perdita di peso di iperplasia e perdita di funzionalità tissutale. Questi risultati sono accompagnati dall'osservazione che in assenza del recettore per IL-4 le cellule Th producono maggiori livelli di IFN γ poiché l'assenza del segnale promosso da IL-4 induce una risposta di tipo Th1. IFN γ inibisce la polarizzazione dei linfociti a cellule Th17, le quali producendo IL-17 che è una citochina altamente infiammatoria. Quindi si può supporre che l'elevata quantità di IFN γ protegga i tessuti intestinali dall'azione fortemente infiammatoria di IL-17.

Possiamo concludere dicendo che lo studio dei processi cellulari e molecolari alla base dello sviluppo e della funzione delle cellule Treg sarà utile per lo sviluppo di nuove strategie per la cura e la prevenzione di malattie immunologiche e per il controllo più ad ampio spettro della risposta immunitaria fisiologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K., AND Masuda T. Organ specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cells subset. Evidence for the active participation of T cells natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. **1985**. *J. Exp. Med.* 161: 72-87.
2. Powrie F., and Mason D. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by OX-22^{low} subset. **1990**. *J. Exp. Med.* 172: 1701-1708.
3. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., and Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chain (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. **1995**. *J. Immunol.* 155:1151-1164.
4. Singh B., Read S., Asseman C., Malmstrom V., Mottet C., Stephens L.A., Stepankova R., Tlaskalova H., and Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **2001**. *Immunol. Rev.* 182: 190-200.
5. Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepfer B., and Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **2001**. *Nat. Genet.* 27: 68-73.
6. Fontenot J.D., Gavin M.A., and Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **2003**. *Nat. Immunol.* 4:330-336.
7. Hori S., Nomura T., and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **2003**. *Science.* 299: 1057-1061.
8. Khattri L., Cox T., Yasayko S.A., and Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **2003**. *Nat. Immunol.* 4: 337-342.

9. Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., Feuerer M., Lapan A.D., Stroud J.C., Bates D.L., Guo L., Han A., Ziegler S.F., Foxp3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **2006.** *Cell.* 126:375-387
10. Chen C., Rowell E.A., Thomas R.M., Hancock W.W., and Wells A.D. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. **2006.** *J. Biol. Chem.* 281: 36828-36834.
11. Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A., Chu T.T, Gavin M.A., and Rudensky A.Y. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. **2007.** *Nature.* 445:936-940.
12. Wan Y.Y., and Flavell R.A. Regulatory T cell function are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. **2007.** *Nature.* 445:766-770.
13. Bettelli E., Carrier Y., Gao W. and Kruchoo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **2006.** *Nature.* 441:235-238.
14. Sakaguchi S., Takahashi T., and Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. **1982.** *J. Exp. Med.* 156:1577-1586.
15. Yao Z., Kanno Y., Kerényi M., Shevac E.M. Non redundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. **2007.** *Blood.* 109:4368-4375.
16. Fontenot J.D., Gavin M.A. and Rudensky A.Y. A function for IL-2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **2005.** *Nat. Immunol.* 6:1142-1151.
17. Shevach E.M., Di Paolo R.A., Andersson J., Zhao D.M., and Thornton A.M. The lifestyle of naturally occurring Cd4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. **2006.** *Immunol.* 212:60-73.
18. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.S., Kanno Y., Chen Z., Yao Z. IL-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. **2007.** *Immunity.* 26:371-381.

19. von Bohemer H., Mechanism of suppression by suppressor T cells. **2005**. *Nat. Immunol.* 6:338-344.
20. Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., and Stokinger B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **2006**. *Immunity*. 24:170-189.
21. Mucida D., Park Y., Kim G., Turovskaya O., Scott I., and Cheroutre H. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **2007**. *Science*. 317:256-260.
22. Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., and Weiner H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalitis. **1994**. *Science*. 265: 1237-1240.
23. Yamaguchi T., Hirota K., Nagahama K., Ohkawa K., and Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cell expressing the folate receptor. **2007**. *Immunity*. 27: 145-159.
24. Collison L.W., Workman C.J., and Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T cell function. **2007**. *Nature*. 450:566-569.
25. Noben-Trauth, L. D. Shultz, F. Bronbacher, Joseph F. Urban, Jr., Hua Gu, and W. Paul. **1997**. An Interleukin (IL-4)-independent pathway for CD4⁺ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Immunology*. 94: 10838-10843.
26. L. Pace, C. Pioli and G. Doria. IL-4 modulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression. **2005**. *The Journal of Immunology*. 174: 7645-7653.
27. W.E. Paul. **1999**. IL-4 receptor signaling mechanisms and function. *Annual Reviews of Immunology*. 17: 701-738.
28. Erb K.J., Ruger B., von Brevern M., Ruffel K.B., Schimpl A., Rivett K. Constitutive expression of IL-4 in vivo causes autoimmune -type disorder in mice. **1997**. *J. Exp. Med.* 185:329-339.

29. L. Pace, C. Pioli and G. Doria. IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression. **2005**. *The Journal of Immunology*. 174: 7645-7653.
30. Malmstrom V., Shipton D., Singh B., Al.Shamkhani A., Puklavec J., Barclay A.N., Powrie F. CD134L Expression dendritic cells in mesenteric LymphNodes drives colitis in T cell-restored scid mice. **2001**. *J. Immunol.* 166: 6972-81.

CUTTING EDGE

Cutting Edge: IL-4-Induced Protection of CD4⁺CD25⁻ Th Cells from CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell-Mediated Suppression¹

Luigia Pace,* Stefania Rizzo,* Cecilia Palombi,* Frank Brombacher,[†] and Gino Doria^{2*}

CD4⁺CD25⁺ T regulatory (Treg) cells are a CD4⁺ T cell subset involved in the control of the immune response. *In vitro*, murine CD4⁺CD25⁺ Treg cells inhibit CD4⁺CD25⁻ Th cell proliferation induced by anti-CD3 mAb in the presence of APCs. The addition of IL-4 to cocultured cells inhibits CD4⁺CD25⁺ Treg cell-mediated suppression. Since all cell types used in the coculture express the IL-4R α chain, we used different combinations of CD4⁺CD25⁻ Th cells, CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and APCs from wild-type IL-4R α ^{+/+} or knockout IL-4R α ^{-/-} mice. Results show that the engagement of the IL-4R α chain on CD4⁺CD25⁻ Th cells renders these cells resistant to suppression. Moreover, the addition of IL-4 promotes proliferation of IL-4R α ^{+/+} CD4⁺CD25⁺ Treg cells, which preserve full suppressive competence. These findings support an essential role of IL-4 signaling for CD4⁺CD25⁻ Th cell activation and indicate that IL-4-induced proliferation of CD4⁺CD25⁺ Treg cells is compatible with their suppressive activity. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 3900–3904.

Efficient and protective immune responses are induced by APCs and result from the balanced participation of T cells with antithetic functions, such as CD4⁺CD25⁻ Th cells and CD4⁺CD25⁺ T regulatory (Treg) cells, whereas their abnormal involvement is associated with pathology. CD4⁺CD25⁺ Treg cells naturally arise in the thymus or are Ag-induced in the peripheral tissues and constitute ~5–10% of the peripheral pool of CD4⁺ T cells in mice and humans. CD4⁺CD25⁺ Treg cells contribute to maintain peripheral tolerance and to prevent a number of immune-mediated diseases by suppressing immune responses to allo- and autoantigens, including tumor Ags (1).

Upon naive Th cells activation, the pattern of cytokines produced plays an important role in the regulation of the immune response. IL-4 is a pleiotropic cytokine that participates in major regulatory mechanisms of the immune response. Yet, the effects of IL-4 on autoimmune diseases have generated contro-

versal results. In systemic lupus erythematosus, experimental allergic encephalomyelitis, cartilage-induced arthritis, and proteoglycan-induced arthritis, IL-4 may promote the expansion of the autoreactive Th cell population (2, 3). This cytokine supports survival and proliferation of both CD4⁺CD25⁻ Th and CD4⁺CD25⁺ Treg cells *in vitro* (4). The cell survival induced by IL-4 results from the ability of this cytokine to sustain the expression of the anti-apoptotic factor Bcl-2 (5). Our recent studies indicate that CD4⁺CD25⁺ Treg cells inhibit the expression of Bcl-2 in cocultured CD4⁺CD25⁻ Th cells. The addition of IL-4 at the time of *in vitro* priming of CD4⁺CD25⁻ Th cells cocultured with CD4⁺CD25⁺ Treg cells profoundly affects the overall expansion of the responding CD4⁺CD25⁻ Th cell population by favoring the survival and proliferation of these cells through the induction of Bcl-2 expression (4).

Since the IL-4R α chain is expressed on different cell types, the possibility of molecular and cellular cross-regulation cannot be excluded. The IL-4R α chain, indeed, is expressed by CD4⁺CD25⁻ Th cells, CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and APCs (4). It follows that treatment of cell cocultures with IL-4 yields results of equivocal interpretation as to which cell type is affected by this cytokine. To overcome this difficulty, the present work analyzed the effect of IL-4 on APC-activating function, CD4⁺CD25⁻ Th cell sensitivity to suppression, and CD4⁺CD25⁺ Treg cell suppressive activity in coculture experiments using combinations of CD4⁺CD25⁻ Th cells, CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and APCs from wild-type IL-4R α ^{+/+} or knockout IL-4R α ^{-/-} mice. Results show that IL-4 preserves CD4⁺CD25⁻ Th cell proliferation in the presence of CD4⁺CD25⁺ Treg cells and demonstrate that IL-4 promotes CD4⁺CD25⁺ Treg cell proliferation without interfering with their suppressive activity.

Materials and Methods

Mice

All mice were of the C57BL/6 strain. IL-4R α ^{-/-} mice (6) were backcrossed for nine generations to the C57BL/6 strain. Mice were housed at the Istituto Superiore di Sanità facilities under pathogen-free conditions. Eight- to 12-wk-old females were used.

*Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy; and [†]Institute for Infectious Diseases and Molecular Medicine, and Division of Immunology, Health Science Faculty, University of Cape Town, South Africa

Received for publication November 4, 2005. Accepted for publication February 1, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Project IAN/F11 from Istituto Superiore de Sanità.

² Address correspondence and reprint requests to Prof. Gino Doria, Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Via Ricerca Scientifica, 00133 Rome, Italy. E-mail address: gino.doria@uniroma2.it

³ Abbreviations used in this paper: Treg, regulatory T; MMC, mitomycin C; γ_c , common γ -chain; foxp3, forkhead box protein P3.

Cell purification

All cell subsets were purified by immunomagnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). APCs were prepared by depletion of CD90⁺ cells. CD4⁺ T cells were enriched by using the MACS MultiSort kit. CD4⁺CD25⁺ Treg cells were purified after staining CD4⁺ T cells with biotinylated anti-CD25 (7D4; BD Pharmingen) and streptavidin microbeads. Collected cells were found to be 95–99% pure by flow cytometry.

Cell sorting

CD4⁺CD25⁻ Th or CD4⁺CD25⁺ Treg cells were labeled with 5 μ M CFSE (Molecular Probes) for 5 min at room temperature. Cells were washed and set up in culture. After 3 days, cells were analyzed by flow cytometry. CFSE⁺ Th cells were isolated by a FACSVantage cell sorter (BD Biosciences). Purity of FACS-sorted cells was 99%.

Proliferation assay

Along with mitomycin C (MMC)-treated T-depleted spleen cells (5×10^4) as APCs, CD4⁺CD25⁻ Th cells (2.5×10^4) were cultured for 3 days in the presence of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in 96-well round-bottom plates in the presence of 1 μ g/ml anti-CD3 ϵ mAb (145-2C11; BD Pharmingen). IL-4 (10 ng/ml, 404-ML; R&D Systems) or IL-2 (2 ng/ml; BD Pharmingen) was added at the beginning of culture. [³H]TdR (1 μ Ci/well) incorporation was measured after the last 4 h of culture by a Packard Matrix 96 Direct Beta Counter. The degree of CD4⁺CD25⁻ Th cell proliferation in the presence of CD4⁺CD25⁺ Treg cells was defined as $100 \times [(\text{cpm of the mixed CD4}^+\text{CD25}^- \text{ Th and CD4}^+\text{CD25}^+ \text{ Treg cell populations})/\text{cpm of CD4}^+\text{CD25}^- \text{ Th cells}]$. SE of the ratio between means was calculated as described elsewhere (4).

Cytokine titration

IL-2 was titrated in culture supernatants by ELISA (Endogen). Avidin-peroxidase (Sigma-Aldrich) was then added. Thereafter, ABTS substrate (Kirkegaard and Perry Laboratories) was added and absorbance was measured at 405 nm.

Results

IL-4-mediated inhibition of suppression requires IL-4R α chain expression by CD4⁺CD25⁻ Th cells

Since the IL-4R α chain is expressed on all cell types involved in the in vitro coculture assay, the mechanism of suppression inhibition by IL-4 has been disentangled by using CD4⁺CD25⁻ Th cells, CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and APCs from IL-4R α ^{+/+} or IL-4R α ^{-/-} mice, in mix and match experiments, according to a matrix of eight IL-4-treated or -untreated cell combinations. CD4⁺CD25⁻ Th and CD4⁺CD25⁺ Treg cells were normally distributed in peripheral lymphoid tissues regardless of the IL-4R α chain expression (data not shown). Results reported in Fig. 1 (*upper left panel*) represent percentages of total cell proliferation by comparing the ability of CD4⁺CD25⁺ Treg cells from IL-4R α ^{+/+} or IL-4R α ^{-/-} mice to suppress IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁻ Th cells cocultured with IL-4R α ^{+/+} APCs in the presence or absence of added IL-4. CD4⁺CD25⁺ Treg cells from both types of mice exerted comparable suppressive activity. The addition of IL-4 to cocultures of IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁻ Th cells, IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cells, and IL-4R α ^{+/+}APCs resulted in increased cell proliferation. Moreover, when IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁻ Th cells were cocultured with IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁺ Treg cells, the addition of IL-4 led to enhancement of T cell proliferation similar to that seen when both subsets expressed the IL-4R α chain.

Fig. 1 (*lower left panel*) shows the ability of IL-4R α ^{-/-} and IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cells to suppress IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁻ Th cells in the presence of IL-4R α ^{+/+} APCs, regardless of the addition of IL-4. The supplement of IL-4 to cocultures of IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁻ Th and IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁺ Treg cells had no effect on CD4⁺CD25⁺ Treg cell suppressive activity. At variance, in cocultures of IL-4R α ^{-/-}

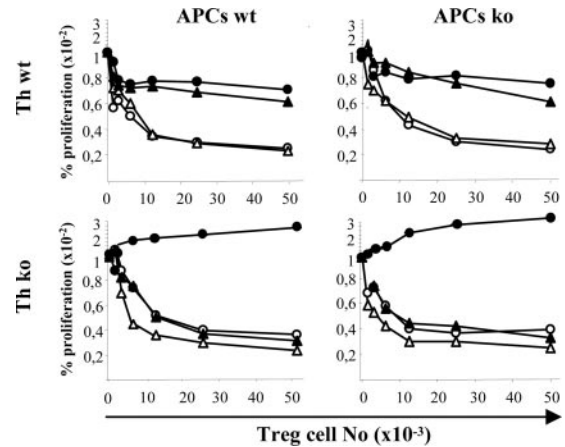


FIGURE 1. IL-4R α chain expression by CD4⁺CD25⁻ Th but not CD4⁺CD25⁺ Treg cells is required to inhibit suppression. CD4⁺CD25⁻ Th cells from IL-4R α ^{+/+} (*upper panels*) or IL-4R α ^{-/-} (*lower panels*) mice were cocultured in triplicate with anti-CD3 mAb in the presence of IL-4R α ^{+/+} APCs (*left panels*) or IL-4R α ^{-/-} APCs (*right panels*) in the absence (○ and △) or presence (● and ▲) of IL-4. The indicated number of CD4⁺CD25⁺ Treg cells from IL-4R α ^{+/+} (● and ○) or IL-4R α ^{-/-} (▲ and △) mice were added to the coculture. [³H]TdR uptake was assessed 3 days later. Results are expressed as percentage of T cell proliferation. Results from one of three independent experiments. wt, Wild type; ko, knockout.

CD4⁺CD25⁻ Th cells and IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cells, the addition of IL-4 induced an increase in total cpm.

Furthermore, results in Fig. 1 (*upper and lower right panels*) exclude the role of the IL-4R α chain on APCs in IL-4-mediated inhibition of CD4⁺CD25⁺ Treg cell suppressive activity.

IL-4 promotes proliferation of CD4⁺CD25⁺ Treg cells without interfering with their suppressive activity

As described above, IL-4 protects CD4⁺CD25⁻ Th cells from CD4⁺CD25⁺ Treg cell-mediated suppression, since, in the presence of IL-4, IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁻ Th cells are refractory to the suppressive activity of IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁺ Treg cells.

Unexpectedly, T cell proliferation was observed when IL-4R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁻ Th cells were cocultured with IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cells in the presence of IL-4. As IL-4 promotes IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cell proliferation (4), in these cocultures suppression is not appraised by the only measurement of [³H]TdR incorporation, and the results remain of equivocal interpretation. This is why we then examined the relative contribution of each cell subset to the total cell proliferation by analysis of the cell division marker CFSE. Before coculture only one cell subset (CD4⁺CD25⁻ Th or CD4⁺CD25⁺ Treg) was stained with CFSE. Experiments were performed using IL-4R α ^{-/-} APCs (Fig. 2). In the absence of IL-4, CFSE-labeled IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁻ Th (CFSE⁺ Th) cells mixed with CFSE⁻CD4⁺CD25⁺ Treg cells showed reduced cell cycle progression (Fig. 2A, *left*). At variance, the addition of IL-4 blocked suppression of IL-4R α ^{+/+}CFSE⁺ Th cells and restored cell cycle progression to near normal levels (Fig. 2A, *right*).

As expected, in the absence of IL-4, IL-4R α ^{-/-}CFSE⁺ Th cells were suppressed by IL-4R α ^{+/+}CD4⁺CD25⁺ Treg cells (Fig. 2C, *left*). Hence, although unpredictable by cpm, IL-4R α ^{+/+}

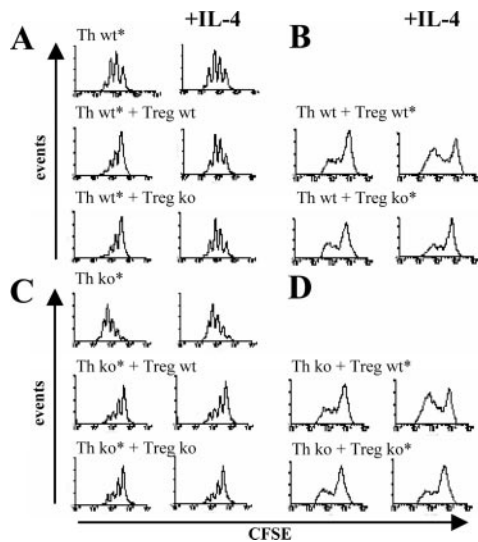


FIGURE 2. Effects of IL-4 on $CD4^+CD25^-$ Th cell proliferation and $CD4^+CD25^+$ Treg cell suppressive activity. $IL-4R\alpha^{+/+}$ or $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^-$ Th (A and C) or $CD4^+CD25^+$ Treg (B and D) cells were labeled with CFSE before coculture. The cell subset labeled with CFSE is marked with an asterisk. For each panel, we indicated the cocultured cell subsets (left side). $IL-4R\alpha^{+/+}$ (A and B) $IL-4R\alpha^{-/-}$ (C and D) $CD4^+CD25^-$ Th cells either alone or mixed with an equal number of $IL-4R\alpha^{+/+}$ or $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^+$ Treg cells were cultured in the presence of $IL-4R\alpha^{-/-}$ APCs and anti-CD3 mAb with (right panels) or without (left panels) addition of IL-4 for 3 days, and then analyzed by flow cytometry. Results of one from three independent experiments. wt, Wild type; ko, knockout.

$CD4^+CD25^+$ Treg cells exerted suppression also in the presence of IL-4, as indicated by the inhibition of the dilution of the CFSE marker in cocultured $IL-4R\alpha^{-/-}$ CFSE⁺ Th cells.

We also performed CFSE analysis on $IL-4R\alpha^{+/+}$ or $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^+$ Treg (CFSE⁺ Treg) cells cocultured with CFSE⁻ $IL-4R\alpha^{+/+}$ or $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^-$ Th cells (Fig. 2, B and D). In the presence of IL-4, $IL-4R\alpha^{+/+}$ CFSE⁺ Treg cells proliferate. $IL-4R\alpha^{+/+}$ CFSE⁺ Treg cell proliferation was found relatively greater when these cells were cocultured in the presence of $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^-$ Th cells. Thus, IL-4 promotes pro-

liferation of $IL-4R\alpha^{+/+}$ $CD4^+CD25^+$ Treg cells without interfering with their suppressive activity.

$CD4^+CD25^+$ Treg cells inhibit IL-2 production by $CD4^+CD25^-$ Th cells in the presence of IL-4

Beside suppressing $CD4^+CD25^-$ Th cell proliferation, $CD4^+CD25^+$ Treg cells have been shown to inhibit IL-2 production. Because suppression of IL-2 production has been observed also in the presence of proliferating $CD4^+CD25^-$ Th cells and $CD4^+CD25^+$ Treg cells (7), we subsequently analyzed IL-2 production in culture supernatants collected from the cocultures described in Fig. 1. Results in Fig. 3 show that in all cocultures, IL-2 production was inhibited.

$IL-4R\alpha^{+/+}$ but not $IL-4R\alpha^{-/-}$ $CD4^+CD25^-$ Th cells escape from the $CD4^+CD25^+$ Treg cell-induced unresponsiveness

Our results demonstrate that, although $IL-4R\alpha^{+/+}$ $CD4^+CD25^-$ Th cells cocultured with $CD4^+CD25^+$ Treg cells proliferate in the presence of IL-4, $CD4^+CD25^+$ Treg cells still retain their suppressive activity to inhibit IL-2 production. Several studies sustain a central role of IL-2 in T cell responses, as this cytokine may control the development and subsequent contraction of Ag-specific cell proliferation. However, more recent data demonstrate that Th cells may proliferate also in a IL-2R-independent manner (8). With regard to $CD4^+CD25^+$ Treg cell suppressive function, the inhibition of IL-2 production should not represent the only mechanism by which suppressor cells interfere with immunity. Since $CD4^+CD25^+$ Treg cells can suppress the autoimmune response of $IL-2^{-/-}$ or IL-2R-deficient T cells (9, 10), it excludes the possibility that competition for IL-2 or suppression of IL-2 transcription represents an essential mechanism of suppression in vivo (11). Based on these considerations, the analysis of IL-2 production alone may be insufficient to account for the suppressive activity of $CD4^+CD25^+$ Treg cells. This is why we decided to analyze in more detail the effect of $CD4^+CD25^+$ Treg cells on $CD4^+CD25^-$ Th cell proliferation. We evaluated $CD4^+CD25^-$ Th cell responsiveness to secondary culture after an initial incubation with $CD4^+CD25^+$ Treg cells with or without the addition of IL-4. To this end, $CD4^+CD25^-$ Th cells were stained with the cell division marker CFSE (CFSE⁺ Th

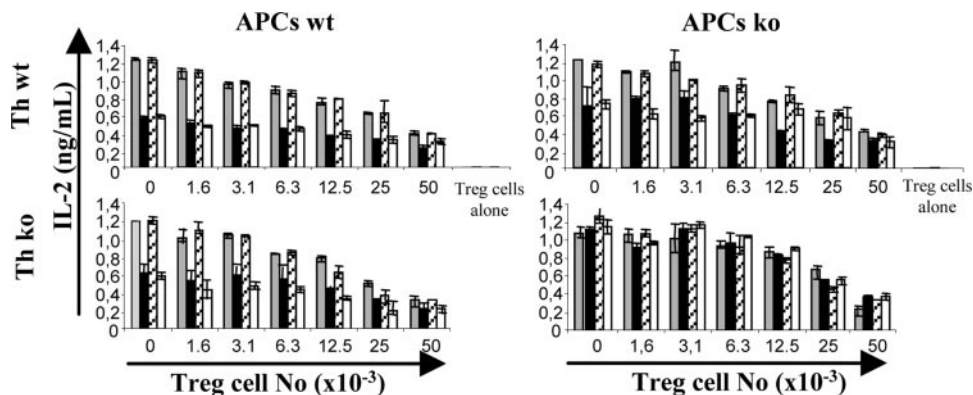


FIGURE 3. In the presence of IL-4, $CD4^+CD25^+$ Treg cells inhibit IL-2 production. IL-2 concentration was measured in supernatants collected from cocultures described in Fig. 1 legend. $CD4^+CD25^-$ Th cells from $IL-4R\alpha^{+/+}$ (upper panels) or $IL-4R\alpha^{-/-}$ (lower panels) mice were cocultured in triplicate with anti-CD3 mAb in the presence of $IL-4R\alpha^{+/+}$ APCs (left panels) or $IL-4R\alpha^{-/-}$ APCs (right panels) in the presence of $IL-4R\alpha^{+/+}$ Treg cells (□); $IL-4R\alpha^{+/+}$ Treg cells plus IL-4 (■); $IL-4R\alpha^{-/-}$ Treg cells (▨); and $IL-4R\alpha^{-/-}$ Treg cells plus IL-4 (□). Treg cells alone (2.5×10^4), cultured with APCs and anti-CD3 mAb, were used as control. Data are the mean \pm SE from one of three independent experiments. wt, Wild type; ko, knockout.

cells) before coculture. Thereafter, IL-4R $\alpha^{+/+}$ or IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{+}$ Th cells were cocultured with IL-4R $\alpha^{+/+}$ or IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells and IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{-}$ APCs in medium supplemented or not with IL-4 as indicated in Fig. 4. After 3 days of primary coculture, CFSE $^{+}$ Th cells were FACS sorted based on their CFSE signal and analyzed for their proliferative response to TCR and/or IL-2 stimulation, in the presence of MMC-treated IL-4R $\alpha^{+/+}$ splenocytes as APCs. If the major effect of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells was to suppress IL-2 production by CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells, thus leading to inhibition of cell proliferation, then sorted CFSE $^{+}$ Th cells should normally proliferate upon secondary restimulation with anti-CD3 mAb alone or combined with IL-2. Relevant results are reported in Fig. 4. The data show that FACS-sorted CFSE $^{+}$ Th cells primed in the presence of APCs normally proliferate in response to IL-2 and/or TCR stimulation. Conversely, IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{+}$ Th cells cocultured with either IL-4R $\alpha^{+/+}$ or IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells in medium supplemented or not with IL-4 were profoundly impaired in their ability to proliferate in response to anti-CD3 mAb and/or IL-2 as compared with IL-4R $\alpha^{+/+}$ or IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{+}$ Th cells cultured in the presence of IL-4 during priming. Similar results were obtained when IL-4R $\alpha^{+/+}$ CFSE $^{+}$ Th cells were cocultured with IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells and subsequently restimulated. Thus, addition of IL-2 or TCR stimulation failed to recover the CFSE $^{+}$ Th cell proliferative response, suggesting that responsiveness to both TCR and IL-2 stimulations are blocked after the CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell encounter. Moreover, although IL-4 promotes proliferation of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells, these cells retain their ability to suppress IL-4R $\alpha^{-/-}$ CFSE $^{+}$ Th cells, which are refractory to restimulation.

We used the aforementioned experimental design to elucidate whether the role of IL-4 in blocking CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell-mediated suppression was simply due to exogenous IL-4, which compensates for the absence of IL-2 production, or to an

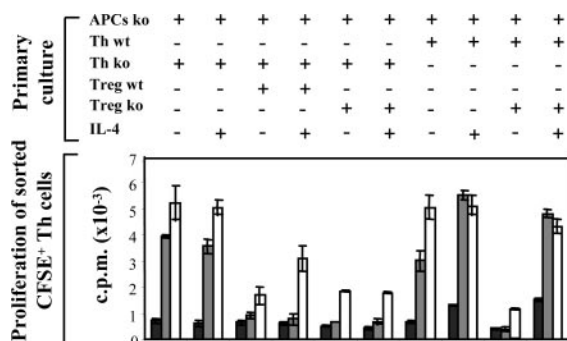


FIGURE 4. IL-4 protects IL-4R $\alpha^{+/+}$ but not IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells from CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell-induced unresponsiveness. CFSE $^{+}$ IL-4R $\alpha^{-/-}$ Th cells alone or mixed with an equal number of CFSE $^{-}$ IL-4R $\alpha^{+/+}$ or IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells, or CFSE $^{+}$ IL-4R $\alpha^{+/+}$ Th cells alone or mixed with an equal number of CFSE $^{-}$ IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells were cocultured in the presence of IL-4R $\alpha^{-/-}$ APCs and anti-CD3 mAb with or without IL-4 as indicated in the primary culture conditions. After 3 days, CFSE $^{+}$ Th cells were FACS sorted. Thereafter, FACS-sorted CFSE $^{+}$ Th cells were cultured in triplicate for 3 days in the presence of MMC-treated IL-4R $\alpha^{+/+}$ splenocytes as APCs, with anti-CD3 mAb (■), IL-2 (□), or anti-CD3 mAb and IL-2 (▨). Levels of proliferation are measured as cpm \pm SE. Results of one of six independent experiments. wt, Wild type; ko, knockout.

active mechanism of protection of cell proliferation exerted by IL-4. When IL-4R $\alpha^{+/+}$ CFSE $^{+}$ Th cells were cocultured with IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells in the presence of IL-4, the former cells proliferate upon secondary restimulation, similarly to IL-4R $\alpha^{+/+}$ Th cells primed alone in medium supplemented with IL-4. Thus, IL-4 exerts an active mechanism of protection of Th cell proliferation, since only Th cells pre-treated with IL-4 in the presence of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells normally proliferate following TCR and/or IL-2R stimulation.

These findings suggest that inhibition and subsequent deprivation of IL-2 production by Th cells cannot be considered as the only mechanism of inhibition of Th cell proliferation, but other mechanisms induced by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells should be responsible for the block of the Th cell proliferative response (12).

Discussion

We have previously shown that IL-4 inhibits CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell-mediated-suppression, but the mechanism and detailed cell analysis of the IL-4-mediated block of suppression remained elusive (4). Because IL-4R $\alpha^{-/-}$ mice lack activation by IL-4 signaling, the use of cells from IL-4R $\alpha^{-/-}$ mice provided the opportunity to identify the cellular target in IL-4-induced protection from CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell-mediated suppression. We used different combinations of CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells, or APCs from either wild-type or knockout mice at the IL-4R α locus, cocultured in the presence or absence of added IL-4. The present results demonstrate that IL-4 protects IL-4R $\alpha^{+/+}$ but not IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells from CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell-mediated suppression, and the former cells proliferate to normal levels when subsequently restimulated. At variance, CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells cocultured with CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells in the absence of IL-4 are unable to proliferate upon secondary stimulation. Nonetheless, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells retain full competence to inhibit IL-2 production. As previously demonstrated (4), the addition of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells to CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cells cultured in the presence of IL-4 also decreased the number of cultured IL-4-producing Th cells, with an increase in IFN- γ production. Based on these findings, at least two distinct pathways of suppression have been identified: 1) the inhibition and subsequent block of Th cell proliferation, which is prevented by the addition of IL-4; and 2) the suppression of IL-2 and IL-4 production, which occurs also in the presence of IL-4. The inhibition of these cytokines might represent a feedback mechanism exerted by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells to counteract the mitogenic effects exerted by exogenous IL-4.

Because IL-4 promotes CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell proliferation (4), we were interested in investigating whether, in the presence of IL-4, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cell suppressive activity was preserved. Our data reveal that upon IL-4 stimulation, CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells proliferate without losing their ability to suppress IL-4R $\alpha^{-/-}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Th cell proliferation. Thus, proliferation and suppressive function of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells are not always mutually exclusive *in vitro*, confirming results already obtained *in vivo* (11).

It is well known that some cytokines may be involved in lymphoid homeostasis by modulating cell survival, growth, differentiation, and apoptosis. Namely, IL-2, IL-4, IL-7, and IL-15, that signal through receptors sharing the common γ -chain (γ_c), have been shown to promote lymphoid cell proliferation and development *in vivo* (5). Of note, similar to IL-4, IL-2 and IL-7

also have been described as interfering with CD4⁺CD25⁺ Treg cell suppressive function (13). Noteworthy, among the γ_c cytokine family, IL-2 is necessary to maintain peripheral CD4⁺CD25⁺ Treg cells. In the absence of IL-2 signal, IL-2^{-/-} or IL-2R α ^{-/-} mice have reduced frequencies of peripheral foxp3⁺ Treg cells. Conversely, no foxp3⁺ Treg cells are detectable in γ_c -deficient mice, indicating that γ_c signals are absolutely required for CD4⁺CD25⁺ Treg cell development and that other γ_c family cytokines are able to partially compensate for the absence of IL-2 in IL-2^{-/-} or IL-2R α ^{-/-} mice. The functional competence of IL-2^{-/-} or IL-2R α ^{-/-}CD4⁺CD25⁺ Treg cells is provided by a less severe lymphoproliferative autoimmune syndrome and greatly extended life span of these mice as compared with foxp3^{-/-} mice (14). The γ_c family cytokines able to compensate for IL-2 are unknown. Our data suggest IL-4 as a possible candidate in vitro (4). Since IL-4^{-/-} and IL-4R α ^{-/-} mice normally develop CD4⁺CD25⁺ Treg cells, it is clear that the major contribution of IL-4 to maintenance and expansion of CD4⁺CD25⁺ Treg cells should become relevant after immune activation and better evidenced in type-2 responses, because under these conditions the effect of IL-4 is dominant.

The results presented herein stress the role of IL-4 as growth factor since IL-4 enhances TCR-induced cell proliferation and protects CD4⁺CD25⁻ Th cells from suppression. These results are relevant to questions concerning the contribution of IL-4 to some autoimmune diseases, as IL-4 could have opposite effects on the pathogenesis of the autoimmune disease according to the disorder stage and cells involved (2). The first critical evidence for the role of IL-4 in the pathogenesis of autoimmune disease stems from the observation that constitutive expression of IL-4 causes autoimmune-type disorders in murine multiple organs (15). This finding was followed by more detailed studies. There is evidence suggesting that IL-4 has limited capacity to inhibit IL-4NODBDC2.5 double-transgenic cells to develop insulin-dependent diabetes mellitus (16). Moreover, contrary to expectation, lack of the IL-4R α chain exerted a very significant protective effect on the frequency of insulin-dependent diabetes mellitus (17). Other works on both cartilage-induced arthritis (3) and experimental allergic encephalomyelitis (18) models have shown that Th2 responses may exacerbate the autoimmune disease, rather than displaying a protective function. These findings suggest that IL-4 could activate the autoreactive T cell repertoire, triggering the effector phase of autoimmune diseases and worsen the clinical outcome.

So far there is a widespread acceptance of the immunomodulatory role of CD4⁺CD25⁺ Treg cells as a major tolerance-inducing mechanism that can suppress the response of other pathogenic immune cells (1). Yet, the relative contribution of CD4⁺CD25⁻ Th and CD4⁺CD25⁺ Treg cells to immunity or tolerance is also influenced by a fine tuning of the local cytokine environment at the site of Ag recognition. Upon activation, leukocytes synthesize and secrete cytokines, including IL-4. These cytokines are growth and differentiation factors, so that naive T cells proliferate and differentiate into effector T cells. However, in some pathological conditions characterized by aberrant T cell activation, IL-4 might promote autoreactive

CD4⁺CD25⁻ Th cell expansion by favoring their proliferation and protecting them from CD4⁺CD25⁺ Treg cell-mediated suppression, thus leading to the dangerous effects of IL-4 described in the aforementioned autoimmune diseases. Likewise, the IL-4 inhibition of CD4⁺CD25⁺ Treg cell-mediated suppression is also expected to worsen allergic diseases.

Altogether, our results demonstrate a multiplicity of IL-4 activities on CD4⁺CD25⁻ Th cell proliferation and CD4⁺CD25⁺ Treg cell-mediated suppression after TCR stimulation. These findings of the effects of IL-4 on the regulatory mechanism of Ag-driven T cell proliferation need to be examined in vivo to fully understand the clinical relevance of IL-4 manipulation in autoimmunity and tolerance.

Acknowledgments

We are grateful to R. Carsetti and E. Giorda for cell sorting.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunological self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 531–562.
- O'Shea, J. J., A. Ma, and P. Lipsky. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 37–45.
- Chen, Y., E. Rosloniec, M. I. Goral, M. Boothby, and J. Chen. 2001. Redirection of T cell effector function in vivo and enhanced collagen-induced arthritis mediated by an IL-2R β /IL-4R α chimeric cytokine receptor transgene. *J. Immunol.* 166: 4163–419.
- Pace, L., C. Pioli, and G. Doria. 2005. IL-4 modulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *J. Immunol.* 174: 7645–7653.
- Marrack, P., and J. Kappler. 2004. Control of T cell viability. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 765–787.
- Mohrs, M., B. Ledermann, G. Kohler, A. Dorfmueller, A. Gessner, and F. Brombacher. 1999. Differences between IL-4 and IL-4 receptor α -deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J. Immunol.* 162: 7302–738.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519–6523.
- Malek, T. R., and A. L. Bayer. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 665–674.
- Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik, and A. A. Freitas. 2002. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R α and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J. Immunol.* 169: 4850–4860.
- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R β -deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17: 167–178.
- Von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6: 338–344.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174: 1783–176.
- Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *Eur. J. Immunol.* 34: 366–376.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6: 1142–1151.
- Erb, K. J., B. Ruger, M. von Brevern, B. Ryffel, A. Schimpl, and K. Rivett. 1997. Constitutive expression of interleukin (IL)-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice. *J. Exp. Med.* 18: 329–339.
- Mueller, R., L. M. Bradley, T. Krahl, and N. Sarvetnick. 1997. Mechanism underlying counterregulation of autoimmune diabetes by IL-4. *Immunity* 7: 411–418.
- Radu, D. L., N. Noben-Trauth, J. Hu-Li, W. E. Paul, and C. A. Bona. 2000. A targeted mutation in the IL-4R α gene protects mice against autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12700–12704.
- Lafaille, J. J., F. V., Keere, A. L. Hsu, J. L. Baron, W. Haas, C. S. Raine, and S. Tonegawa. 1997. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause EAE in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J. Exp. Med.* 186: 307–312.