



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

"TOR VERGATA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA E
BIOTECNOLOGIE APPLICATE

XXII CICLO

**EFFETTI IMMUNOREGOLATORI DEGLI INTERFERONI
DI PRIMA CLASSE SULL'ATTIVITA' DELLE CELLULE
CD4⁺CD25⁻ T HELPER E DELLE CELLULE CD4⁺CD25⁺
TREG.**

Dott.ssa Beatrice Dettori

A.A. 2009/2010

Docente Guida Prof. Paolo Rossi

Tutor: Dott.ssa Luigia Pace

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

*Per te Papà,
che mi guardi da
un angolo sperduto del
cielo.*

Indice

1.Il sistema immunitario	6
2.Le cellule T regolatorie	9
2.1.Le cellule T regolatorie di origine Timica (Treg)	11
2.2.Meccanismi di inibizione delle cellule Treg	15
2.3.Le cellule Treg e IL-2	17
2.4.Le cellule Treg e IL-4	18
3.La tolleranza immunologica	19
4.Gli interferoni di primo tipo (IFN-I)	21
4.1.Interazioni di IFN α/β con le altre citochine	23
4.2.IFN α/β nella risposta immunitaria	24
4.3.IFN α/β nelle patologie autoimmuni	25
Scopo del lavoro	27
Materiali e metodi	28
Risultati	33

1. Analisi dell'espressione del recettore IFNAR sulle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	34
2. Effetto di IFN α sull'attivazione delle cellule T CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th.	36
3. IFN α induce l'espressione di IL-2 senza induzione della proliferazione delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th.	39
4. Le cellule APC IFNRA ^{+/+} sono necessarie per la proliferazione delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ in presenza di IFN α .	42
5. IFN α non influenza la vitalità delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg.	45
6. IFN- α induce l'espressione del CD25 e di Ly6C sulle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁻	46
7. IFN α incrementa l'espressione del CD25 e di Ly6C sulle cellule CD4 ⁺ <i>naive</i> .	49
8. Effetti dell'IFN α sull'inibizione indotta dalle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg.	51
9. IFN α inibisce la produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg.	55
10. Distribuzione della popolazione CD4 ⁺ CD25 ⁻ Th e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg in topi IFNAR ^{+/+} e IFNAR ^{-/-} .	57

11. IL-6 non è coinvolta nell'inibizione dell'attività soppressoria delle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg indotta da IFN α .	59
12. L'inibizione della soppressione Necessita dell'espressione di IFNAR sia sulle APC che sulle cellule CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg.	63
Discussione	68
Bibliografia	71
Abstract	77

1. Il sistema immunitario

La risposta immunitaria si è evoluta nei vertebrati come sistema di difesa sia per la salvaguardia dell'organismo contro l'ingresso di molecole estranee potenzialmente patogeni, sia come sistema di controllo dello sviluppo di cellule trasformate che potrebbero causare la morte dell'individuo. Tutti gli organismi viventi dispongono di un sistema di controllo e di difesa dai patogeni esterni. Gli invertebrati non possiedono un sistema difensivo complesso come quello dei vertebrati e la loro protezione si basa sulla produzione di piccoli peptidi con attività antimicrobica e antibiotica.

I vertebrati possono invece contare su un vasto repertorio di cellule di difesa che cooperano insieme, con un'ampia rete di segnali assicurando una efficace difesa dell'organismo. Una fra le più importanti peculiarità del sistema immunitario è la capacità di riconoscere e rimuovere una grande varietà di molecole estranee, e creare cellule di memoria in grado di garantire una risposta protettiva e veloce al ripresentarsi dello stesso antigene. Le cellule del sistema immunitario si generano e risiedono in organi definiti come primari (centrali) e secondari (periferici). Il timo e il midollo osseo sono gli organi centrali dove maturano rispettivamente i linfociti T e i linfociti B, mentre gli organi e i tessuti periferici sono la milza, i linfonodi, le placche di Peyer, le tonsille e il sistema difensivo dell'intestino, dove può avvenire la risposta immunitaria primaria. Un sostanziale numero di leucociti circolano nel sangue e nella linfa, in seguito ad attivazione entrano negli organi periferici dove ha luogo la risposta immunitaria.

La risposta immunitaria si basa sulla cooperazione di cellule con funzioni e caratteristiche differenti che garantiscono una difesa protettiva per l'organismo. La componente innata di tale risposta è completamente aspecifica ed è costituita sia dalle barriere difensive anatomiche e fisiologiche (cute, temperatura corporea, pH

acido dello stomaco) sia dalla componente cellulare composta da macrofagi, monociti del sangue, e neutrofili che fagocitano e incorporano gli antigeni estranei portando, nella maggior parte dei casi, allo loro eliminazione (1,2).

L'immunità acquisita è mediata da classi distinte di cellule i cui rappresentanti principali sono i linfociti T e B. La risposta immunitaria acquisita possiede diverse caratteristiche importanti come la capacità di riconoscere minime differenze chimiche fra due antigeni e di rispondere in maniera protettiva ed efficace contro ognuna di queste. La specificità antigenica del recettore esposto sulla membrana cellulare dei linfociti T e B è generata in maniera casuale durante lo sviluppo di queste cellule mediante un processo di ricombinazione somatica mediato dalle ricombinasi RAG-1/RAG-2 (3) che permettono la formazione di distinti cloni di linfociti con diverse specificità antigeniche. La generazione di una così grande variabilità di cloni T e B comporta un elevato rischio per la formazione di cloni autoreattivi. La cooperazione fra le varie classi di cellule che compongono il sistema immunitario sono fondamentali affinché venga montata una risposta protettiva. Le cellule deputate alla presentazione dell'antigene ai linfociti T (*antigen presenting cells*, APC) sono essenziali per la generazione della risposta acquisita. Tali cellule si possono dividere in APC professionali, che svolgono la sola funzione di presentazione dell'antigene (cellule dendritiche e macrofagi) e APC semiprofessionali che svolgono tale funzione anche se non è la principale (linfociti B). Le APC sono in grado di riconoscere, internalizzare e degradare l'antigene esponendone in membrana i determinanti antigenici, denominati epitopi. Le citochine, proteine o glicoproteine a basso peso molecolare, svolgono ruoli importanti nella regolazione del sistema immunitario. I recettori per le citochine mostrano molte differenze strutturali, che li rendono altamente specifici per il tipo di citochina. Le citochine fino ad ora identificate appartengono alla famiglia delle emopoietine (IL-2, IL-4, IL-7, ect). Legandosi con alta affinità ai rispettivi recettori esposti sulla membrana delle cellule bersaglio, le citochine attivano vie di trasduzione che

portano alla modificazione dell'espressione genica della cellula. Le maggiori attività svolte dalle citochine sono: la regolazione della crescita cellulare e del processo apoptotico, il differenziamento, l'attività citolitica, la chemiotassi, l'induzione e la secrezione di anticorpi. Queste funzioni modulano l'intensità e la durata della risposta immunitaria (1,2).

2. Le Cellule T regolatorie

Le cellule T regolatorie hanno il ruolo fondamentale di stabilire e mantenere il processo di tolleranza periferica. Queste sono una particolare classe di linfociti T che modulano l'intensità e la durata della risposta immunitaria inibendo la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T helper (Th) e dei linfociti T citotossici (Tc) (4). Per questo, i linfociti T regolatori sono definiti come cellule T che inibiscono la risposta immunitaria influenzando l'attività di altri tipi cellulari. Negli ultimi anni l'interesse verso questa classe cellulare è cresciuta enormemente in quanto le cellule T regolatorie giocano un ruolo chiave nella prevenzione delle malattie autoimmuni e delle allergie, nel rigetto nei trapianti d'organo e nella risposta antitumorale (5).

E' noto infatti che un ridotto numero o una ridotta funzionalità dei vari tipi di cellule regolatorie portano all'insorgenza di tali disordini; così come un sovrannumero di tali cellule è in grado di inibire le risposte protettive ai microorganismi patogeni e alle formazioni neoplastiche. Studi in modelli murini, dimostrano che aumentando sperimentalmente, il numero di cellule regolatorie, è possibile attivare un'efficace protezione contro disordini autoimmuni (6). La letteratura evidenzia l'esistenza di diverse classi di cellule regolatorie che nonostante svolgano la stessa funzione modulatrice della risposta immunitaria, si differenziano per i recettori esposti in membrana, la via di differenziamento all'interno dell'organismo e il meccanismo di soppressione, che varia in base al microambiente (tessuto e citochine rilasciate in loco) nel quale esse si trovano ad operare. Si possono riconoscere tre tipi di cellule regolatorie: le regolatorie di tipo 1 (Tr1), le regolatorie di tipo 3 (Tr3) e le regolatorie di origine timica ("natural arising") Treg.

Le cellule Tr1 sopprimono, *in vivo*, la proliferazione delle cellule attivate Th1 e Th2 mediante la produzione

della interleuchina 10 (IL-10). A differenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, che originano direttamente dal timo, queste cellule possono essere indotte in periferia mediante somministrazione di IL-10, sia *in vivo* che *in vitro* (7).

Le cellule Tr3 sono in grado di esplicare la funzione inibitoria mediante la produzione della citochina immunosoppressoria TGF- β . Tale classe di regolatorie è in grado di inibire molte patologie autoimmuni in vari modelli animali come il diabete, la colite e l'encefalopatia autoimmune sperimentale (EAE) (8).

Le cellule T regolatorie di origine timica (Treg) si sviluppano nel timo e poi migrano negli organi periferici e sono caratterizzate dall'espressione costitutiva del fattore di trascrizione Foxp3 (5).

2.1. Le Cellule T regolatorie di origine timica (Treg)

La prima evidenza di cellule in grado di regolare la risposta immunitaria garantendo l'omeostasi delle varie classi cellulari che compongono il sistema immunitario derivano da esperimenti di Nischizuka Y. E Sakakura T. del 1980 che mostravano come la timectomia neonatale di topi normali causava la comparsa di disordini autoimmuni nell'adulto fra cui diabete, colite, gastrite e ooforite. Ulteriore contributo nell'identificazione di questa classe cellulare è stato dato dagli esperimenti di S. Sagakuchi, il quale inoculò topi *nu/nu* (privi del timo) con cellule CD4⁺ prive di una sottopopolazione che esprimeva alti livelli di CD25 (catena α del recettore di IL-2). Il risultato fu l'insorgenza in questi topi di gravi disordini autoimmuni che colpivano indistintamente vari organi. Tali disturbi potevano essere però prevenuti inoculando tutta la popolazione di cellule T CD4⁺.

Le cellule T regolatorie di origine timiche sono una popolazione appartenente ai linfociti T CD4⁺ che esprimono esclusivamente un recettore di tipo $\alpha\beta$ e alti livelli dei recettori CD25, GIRT (*glucocorticoid-induced TNF receptor -related gene*), CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocytes associated antigen-4*), bassi livelli di CD45RB (CD25^{high}CD45RB^{low}GITR^{high}CTLA-4⁺) (5).

Esse costituiscono il 5-10% dei linfociti T CD4 periferici e 1% dei linfociti T CD8, sia nell'uomo che nei roditori. I precursori delle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg originano nel timo dove avviene il loro differenziamento in cellule mature come per tutte le classi di linfociti T. Dopo tale processo escono dal timo raggiungendo gli organi periferici (milza e linfonodi). Nonostante ciò, si è visto che le cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg possono essere generate direttamente in periferia mediante stimolazione *ex vivo* in presenza di citochine come TGF- β e IL-2 (9).

L'induzione della tolleranza mediante somministrazione orale o per via intravenosa dell'antigene in modello murino, porta alla formazione di cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg antigene specifiche a partire da precursori cellulari T *naive*

capaci di inibire la proliferazione cellulare degli effettori (5).

Si ritiene che le cellule $CD4^+ CD25^+$ Treg siano frutto di una linea differenziativa diversificata rispetto a quella che dà origine ai linfociti T $CD4^+$ e T $CD8^+$, guidata dall'espressione del fattore di trascrizione Foxp3. Nel topo tale gene è localizzato sul cromosoma X. Topi mutanti naturali per tale gene sono detti "Scurfy" e mostrano un'iperattivazione dei linfociti che producono elevate quantità di citochine pro-infiammatorie (3,4).

Anche nell'uomo il gene codificante Foxp3 si trova sul cromosoma X e la sua mutazione è correlata ad una patologia letale del nascituro chiamata IPEX (*Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy and X-linked inheritance*) (10). Tale patologia, oltre ad essere caratterizzata da una massiccia proliferazione linfocitaria, che è la causa di disordini autoimmunitari in diversi organi, mostra la totale assenza delle cellule Treg. Questa osservazione ha permesso di dimostrare che Foxp3 è il fattore determinante che guida lo sviluppo di tali cellule.

Il fattore di trascrizione Foxp3 appartiene a una famiglia più vasta di fattori di trascrizione chiamati FOX, ed è costituito da diversi domini strutturali fra cui: *zinc-finger*, una struttura a cerniera di leucina e, al C-terminale, un dominio a forcina con il quale si lega al DNA inibendo la trascrizione dei geni a valle. Il fattore Foxp3 è infatti un regolatore negativo della trascrizione. Studi hanno mostrato come tale fattore riconosca una sequenza di DNA in prossimità di una consenso riconosciuto dal fattore NFAT che attiva la trascrizione di geni codificanti per molte citochine infiammatorie, fra le quali IL-2, IL-4 TNF α . Si ritiene che la proteina Foxp3 competa per il sito di legame al DNA con NFAT, portando all'inibizione della trascrizione delle citochine pro-infiammatorie (3).

Per quanto riguarda la selezione timica delle cellule Treg, si suppone che tale differenziamento, indotto dall'espressione di Foxp3, sia dovuto al grado di affinità del TCR $\alpha\beta$, espresso dalle cellule Treg, per le molecole self presentate dalle molecole MHCII espresse dalle cellule stromali del timo, che è compreso fra il valore di avidità

richiesto per la selezione positiva e la selezione negativa che avviene a livello timico (11). Tuttavia, nonostante tale riconoscimento sia fondamentale per il differenziamento verso un fenotipo regolatorio, diversi autori ritengono che siano coinvolte una o più molecole secrete dalle cellule epiteliali del timo come ad esempio, TGF- β che agirebbe come fattore costimolatorio nell'induzione dell'espressione di Foxp3. Inoltre si mette in evidenza anche l'importanza della formazione di un microambiente citochinico all'interno dei corpuscoli di Hassal, che risulterebbe essenziale per la generazione delle cellule Treg (12). Le cellule epiteliali di tali corpuscoli producono IL-7-like citokine TLSP (*Thimic stromal lymphopoietin*) che promuove l'espressione da parte delle cellule dendritiche di maggiori livelli di molecole costimolatorie come CD80/86; questo promuoverebbe la conversione MHC-dipendente dei linfociti T CD4⁺ CD25⁻ in cellule Foxp3 CD4⁺ CD25⁺ Treg.

Rudensky et Al. Hanno dimostrato che le cellule positive all'espressione di Foxp3 sono cellule Treg. Questi ricercatori hanno costruito una proteina di fusione Foxp3-GFP (*green fluorescein protein*) in modo da poter marcare e osservare, mediante la valutazione dell'emissione di fluorescenza, tutte le cellule positive per Foxp3. Con questo sistema, hanno osservato che tutte le cellule che esprimevano il complesso fluorescente Foxp3-GFP erano CD4⁺CD25⁺, ed anche se una piccola parte di queste cellule non mostrava l'espressione del CD25, queste mantenevano ugualmente la capacità inibitoria (13).

L'importanza del fattore di trascrizione Foxp3 nel promuovere il differenziamento in cellule Treg è confermato da esperimenti che evidenziano come la trasfezione retrovirale del gene Foxp3 in cellule CD4⁺ CD25⁻ Th porti queste ultime ad assumere la funzioni di cellule regolatorie.

La scoperta del gene codificante per questo fattore di trascrizione è stata di notevole importanza, in quanto è attualmente l'unico marcatore certo per l'identificazione delle cellule Treg murine. Infatti l'espressione del CD25 non caratterizza esclusivamente le Treg ma anche tutte le

CD4⁺ attivate. Per questo gli esperimenti condotti in questo lavoro di tesi sono stati eseguiti su animali di laboratorio che non presentano un'attivazione del sistema immunitario.

2.2. Meccanismi di inibizione indotti dalle Treg

Le cellule Treg mostrano un'elevata capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T CD4 e CD8. Tale inibizione è data dal contatto fisico cellula-cellula, e ciò è dimostrato dal fatto che separando le cellule CD25⁺ dalle cellule CD25⁻, mediante una membrana semipermeabile, la soppressione non si verifica (1).

Le Treg provenienti da topi *knockout* (ko) per citochine coinvolte in processi di inibizione cellulare, mantengono la capacità soppressoria. Si suppone che le Treg svolgano la loro funzione inibitoria mediante il blocco degli m-RNA per IL-2, determinando il blocco del ciclo cellulare fra la fase G1 e la fase S (14).

Sono stati ipotizzati molti modelli che cercano di delucidare il meccanismo mediante il quale le cellule Treg inibiscono lo sviluppo di cloni di cellule T CD4⁺ reattive. E' ormai chiaro che le Treg attivano variazioni di un meccanismo inibitorio tipico in base al microambiente in cui si trovano ad esercitare la loro attività, questa quindi risulta principalmente dalla combinazione di citochine secrete nel luogo dell'infiammazione e dal tipo di attivazione che viene indotto sulle cellule Treg mediante il segnale del TCR. Ad esempio è stato dimostrato che la colite autoimmune è tenuta sotto controllo dalle cellule Treg mediante la produzione di IL-10, mentre nella prevenzione della gastrite autoimmune IL-10 non è necessaria (8). In generale si ritiene che l'inibizione delle Treg indotta dal contatto cellulare sia determinata dalla presenza di recettori di membrana che trasducono un segnale di inibizione della proliferazione: il recettore CTLA-4 espresso sulla membrana cellulare delle Treg che si lega al CD80/86 sulla membrana delle cellule T attivate, dopo che a entrambe le cellule è stato presentato l'antigene da parte delle APC (14).

Le Treg possono inibire la proliferazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ mediante l'utilizzo della citochina TGF- β . Alcuni autori hanno proposto che il legame fra TGF- β espressa dalle Treg e il recettore del TGF- β (TGF- β RII) ,esposto sulla membrana dei linfociti, vada ad inibire la

proliferazione e la secrezione di citochine da parte di queste cellule (15).

In vitro è stata osservata la capacità delle cellule Treg umane di indurre la morte di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ attivati mediante la via del Granzima A e delle perforine, mentre nel topo la soppressione indotta dalle Treg è mediata dal Granzima B (GZ-B). Infatti cellule Treg purificate da topi GZ-B^{-/-} mostrano una compromessa capacità soppressoria. Inoltre questo processo risulta indipendente dalle perforine, in quanto cellule Treg purificate da topi ko per le perforine mantengono capacità soppressoria uguale alle cellule Treg di controllo (16). Un altro meccanismo di inibizione della proliferazione cellulare indotto dalle Treg riguarda l'attivazione dell'enzima IDO (*idoleamine 2-3 dioxygenasi*). Tale enzima è coinvolto nel metabolismo del triptofano libero, amminoacido importante per la proliferazione dei linfociti T. Si suppone che il legame fra il CTLA-4 sulla membrana delle Treg e il CD80/86 esposto sulla cellula dendritica (DC), attivi l'enzima IDO a metabolizzare il triptofano libero riducendone la quantità disponibile, causando l'inibizione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule T (14). Anche il recettore per i glucocorticoidi, GITR, espresso dalle Treg circolanti ad alti livelli, svolge un importante ruolo nella regolazione dell'attività delle Treg. E' stato osservato che una stimolazione di questo recettore dopo 24 ore di co-coltura promuove la soppressione delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th. Tuttavia la stimolazione di GITR con un mAb specifico, blocca l'attività soppressoria delle Treg (1, 17).

2.3. Le Cellule Treg e IL-2

Interleuchina-2 (IL-2) è una citochina di fondamentale importanza per mantenere costante il numero delle cellule Treg negli organi linfoidi (5). Topi ko per IL-2 o per il suo recettore (IL-2R) mostrano una notevole riduzione del numero delle cellule Treg periferiche, comportando lo sviluppo di una severa autoimmunità a pochi giorni dalla nascita. Si ritiene che la funzione soppressoria delle Treg si attui principalmente mediante blocco dell'espressione e del rilascio della IL-2. Infatti *in vitro*, si dimostra che in colture costituite da linfociti $CD4^+CD25^-$ Th e $CD4^+CD25^+$, in presenza di APC o linfociti B, la soppressione della proliferazione delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th e l'inibizione della produzione di IL-2 da parte di queste, aumentino all'aumentare del numero di Treg messe nelle co-culture (18).

Nonostante ciò, IL-2 non si rileva una citochina importante per l'azione soppressoria delle cellule Treg, infatti l'inoculo in topi ko per IL-2 e IL-2R, di cellule Treg mostrano un miglioramento della sindrome autoimmune, dimostrando che l'azione inibitoria non necessita di IL-2 *in vivo* (14).

2.4. Le cellule Treg e IL-4

L'effetto di IL-4 sulle cellule regolatorie è duplice, poiché essa appare coinvolta sia nel mantenimento e nella proliferazione delle cellule Treg sia nell'inibizione della loro attività regolatoria, contrastando la soppressione della proliferazione cellulare indotta dalle cellule Treg.

IL-4 quindi sembra quindi 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 Rivett, è riportato che topi che esprimono costitutivamente IL-4 mostrano una grave iperattivazione del sistema immunitario, dato dall'incremento delle immunoglobuline sieriche IgG, IgE e un aumento dell'espressione di molecole MHCII 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 anticorpi contro IL-4, questo risulta protetto dallo sviluppo di questi disordini autoimmuni, confermando che IL-4 è la citochina maggiormente coinvolta nell'induzione di sindromi autoimmunitarie in questo modello murino (19).

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 anti-apoptotico Bcl-2. Inoltre si dimostra che cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg inibiscono la produzione di IL-4 da parte delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th e che tale condizione aumenta la produzione di IFN γ che favorisce una risposta immunitaria di tipo Th1 (20).

3. La tolleranza immunologica

La discriminazione fra ciò che è proprio dell'organismo (self) e ciò che non lo è (not-self) è di fondamentale importanza per evitare lo sviluppo di una risposta immunitaria aberrante contro i tessuti dell'organismo che potrebbe condurre all'insorgenza di patologie autoimmunitarie. Diversi meccanismi sono in grado di prevenire questi fenomeni, assicurando uno stato di tolleranza verso il self (1, 2). Una risposta immunitaria adeguata ed efficace risulta dal mantenimento dell'equilibrio fra cellule effettrici (linfociti T e B) e cellule che regolano la risposta immunitaria: le cellule T regolatorie (Treg). La rottura di tale equilibrio può portare da una parte ad un'eccessiva inibizione degli effettori conducendo ad una risposta immunitaria scarsamente protettiva verso le infezioni e lo sviluppo dei tumori, dall'altra, alla perdita della tolleranza verso gli antigeni self favorendo l'insorgenza di disordini autoimmuni (21).

La deplezione delle cellule $CD25^+CD4^+$ Treg induce l'insorgenza di malattie autoimmuni come la comparsa della colite autoimmune (IBD) in topi sani (22).

Le sindromi autoimmuni possono essere riprodotte sperimentalmente mediante il trasferimento di cellule deplete di Treg provenienti da topi adulti sani e trasferite in topi singenici mancanti di linfociti T (23). Il timo di un animale adulto allo stesso tempo è in grado di generare potenziali cellule T autoreattive verso il self così come cellule Treg. Le cellule T reattive verso il self vengono generate casualmente a dispetto della selezione negativa indotta nel timo grazie alla presentazione da parte delle cellule dendritiche midollari (DC) di antigeni self. Visto che sia le cellule $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg sia le cellule $CD4^+CD25^-FOXP3^-$ Th sono sottoposte alla stessa selezione timica, è chiaro che il timo sia capace generare entrambe le popolazioni cellulari in modo bilanciato, favorendo la generazione delle Treg (21).

Stimolazioni *in vitro* di cellule T $CD4^+$ deplete delle cellule Treg provenienti da sangue periferico di individui adulti sani hanno mostrato come esistano cloni cellulari reattivi

verso il self, come per esempio alla GAD65 (*glutamic decarboxylase-65*), alla mielina, alle proteine dello shock termico. Queste cellule autoreattive non si trovano in stato anergico, e rispondono *in vitro* dopo l'esposizione agli antigeni self mediante proliferazione e rilascio di interferone gamma (IFN- γ). Se le cellule Treg vengono aggiunte alla co-coltura, il sistema viene inibito (24). Studi svolti in pazienti affetti da sclerosi multipla (MS) evidenziano un difetto funzionale delle cellule CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg; l'encefalopatia autoimmune sperimentale (EAE), l'analoga murina della MS umana, mostra il ruolo protettivo esercitato dalle cellule CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg nella demielinizzazione delle fibre nervose, che inibendo l'attivazione e la proliferazione delle cellule Th1-mielina specifiche negli organi linfoidi periferici contribuiscono al mantenimento della tolleranza verso il self (25).

4. Gli interferoni di primo tipo (IFN-I)

Le citochine giocano ruolo cruciale nella regolazione di tutti gli aspetti funzionali del sistema immunitario, come la differenziazione cellulare, l'omeostasi, la tolleranza, l'immunità e lo sviluppo della memoria immunologica.

Gli interferoni (IFNs), sono citochine pleiotropiche in grado di influenzare sia quantitativamente che qualitativamente la risposta immunitaria innata e quella adattativa (26). L'iniziale produzione di IFN α/β e IFN γ sono essenziali per l'istaurarsi della risposta inatta, che a sua volta agisce da stimolo per la risposta adattativa mediante una maggiore espressione del sistema MHC sulle cellule e delle molecole costimolatorie (27); inoltre il segnale mediato da tali citochine è in grado di attivare la trascrizione genica di molti geni, inducendo la produzione delle stesse e di altre citochine importanti per lo sviluppo di una corretta risposta immunitaria. Sulla omologia delle sequenze amminoacidiche, gli interferoni sono stati suddivisi in due tipi: interferone di tipo uno (IFN-I) e interferoni di tipo due (IFN-II). Queste molecole fanno parte a loro volta, della famiglia delle citochine ad α -elica, che includono anche IL-10, IL-19, IL-22, IL-24 e IL-26.

IFN-I sono prodotti da molte cellule, e sono composti da molti membri: $\alpha, \beta, \epsilon, \delta, \tau, \omega$. Di queste, IFN- α e IFN- β (IFN- α/β) sono prodotte principalmente delle cellule dendritiche plasmocitoidi (pDC) e sono quelle immunologicamente più rilevanti (28). Sia il genoma umano che quello murino contengono un solo gene codificante per IFN- β e circa 20 geni che codificano per IFN- α , dei quali solo 13 funzionanti. La ragione dell'abbondanza del numero di sottotipi di IFN α rimane non del tutto chiara, anche se si pensa che i vari tipi di IFN α abbiano differenti funzioni e vengano espressi diversamente in base al tipo cellulare e all'agente attivante (26, 28).

Recentemente è stato descritto l'IFN- λ , che sembra avere le stesse funzioni di IFN- α/β , ma presenta una struttura, una localizzazione cromosomica distinta (26).

Il recettore di IFN- α/β è un etero-dimero composto dalla subunità 1 (IFNAR1) e dalla subunità 2 (IFNAR2)(26).

Sebbene la citochina si leghi a IFNAR2, entrambe le subunità sono necessarie per la trasduzione del segnale. Il legame di IFN- α/β al recettore porta alla dimerizzazione delle due subunità che vengono fosforilate mediante le chinasi (Tyk2 e Jak1) associate al recettore. Ciò induce l'attivazione dei fattori di trascrizione STAT1 e STAT2 che dimerizzano e si legano a IRF-9 (IFN-regulatori factor 9) a formare ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) il quale si lega ai promotori contenenti la sequenza ISRE (IFN-stimulated response elements) che iniziano la trascrizione genica (29).

IFN- α/β possono anche indurre la formazione dell'omeodimero STAT1 che stimola la trascrizione dei geni codificanti per IFN γ (GAS), l'unica citochina classificata come IFN- II.

Le cellule che producono IFNs (*interferon-producing cells*, IPC) sono state scoperte nel 1980 e costituiscono una piccola popolazione di leucociti che in risposta all'infezione virale rilasciano alti livelli di IFN-I. Attualmente si pensa che queste cellule abbiano origine sia dalla linea linfoide sia da quella plasmocitoide, costituendo una popolazione eterogenea di cellule bloccate allo stato immaturo (30). Fra le IPC, le pDC sono le cellule che producono maggiori quantità di IFN α , capaci di secernere circa 1000 volte più citochina rispetto alle altre IPC, quando attivate dallo stimolo microbico. Nel sangue periferico umano le cellule pDC sono identificate dai seguenti marcatori di superficie: CD4⁺CD123⁺CD68⁺CD45RA⁺CD11c⁻, mentre quelle murine esprimono: CD11b⁻, CD8 α ⁻CD11c^{+/-}B220⁺Ly6C⁺MHC-II^{+/-}. Queste cellule si originano da un precursore comune a tutte le cellule dendritiche. Il numero delle pDC negli organi linfoidi è solitamente molto bassa ma *in vitro* la popolazione può essere espansa con il fattore GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (29, 30).

4.1. Interazioni di IFN α/β con le altre citochine

IFN- α/β e IFN γ attivano, direttamente e indirettamente, molti fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo e nell'attivazione delle cellule del sistema immunitario (27). La reciproca attivazione e regolazione fra gli interferoni di primo e secondo tipo influenza l'espressione e la funzione di molte altre citochine, e ciò risulta importante sia per l'attivazione di una risposta immunitaria protettiva, sia per l'insorgenza di patologie autoimmuni.

IFN- α/β modulano l'espressione e il segnale di molte citochine e dei loro recettori, tale effetto include sia l'aumento della sintesi di IFN γ da parte delle DCs e linfociti T che favorisce la sopravvivenza e l'induzione delle Th1, l'aumento dell'IL-6 prodotta dalle APC, l'inibizione del fattore STAT-4 mediante l'inibizione di IL-4, la regolazione negativa dell'espressione di IL-12 e l'aumento dell'espressione di IL-15 (28).

4.2. IFN α/β nella risposta immunitaria

Il rilascio di elevate quantità di IFN- α/β è attivato dal legame delle molecole patogene con i TLRs (*tool like receptors*) espressi sulle membrane cellulari. La trasduzione del segnale attraverso i TLR porta alla fosforilazione di IRF-3, il fattore di trascrizione chiave coinvolto nell'espressione di IFN- β . A sua volta la produzione di IFN- β porta al legame di questa citochina al recettore comune di IFN- α/β che induce l'attivazione di IRF-7 e quindi all'espressione di IFN- α . IFN- α/β direttamente e indirettamente agiscono sull'attivazione e la funzione delle cellule del sistema immunitario. Il maggiore effetto è quello dell'attivazione delle DC che aumentano l'espressione delle MHC, specialmente MHCI e delle molecole costimolatorie (DC40, CD80 e CD86), delle chemiochine e dei loro recettori, portando ad un efficiente *homing* delle DC verso gli organi periferici secondari e attivazione dei linfociti T (31).

IFN- α/β promuove l'attività citotossica delle cellule NK, così come lo sviluppo, l'attivazione e la produzione di ossido nitrico (NO) da parte dei macrofagi (2, 32). In base al tipo di STAT che inducono, IFN- α/β possono promuovere, indirettamente, la proliferazione e la sopravvivenza dei linfociti T inducendo la produzione di IL-15 da parte delle APC (29, 33) ; oppure possono indurre apoptosi e inibire la proliferazione dei linfociti T, mediante l'attivazione delle caspasi o l'inibizione delle cicline (34).

4.3. IFN α/β nelle patologie autoimmuni

Gli interferoni di primo tipo sono mediatori molto importanti sia per la risposta immunitaria innata che per quella adattativa, per questo hanno un ruolo centrale nell'induzione e nell'inibizione della risposta autoimmune. Recenti studi su due patologie autoimmuni molto diffuse come il lupus sistemico eritematoso (SLE) e il diabete di tipo 1 (IDDM), hanno messo in luce una popolazione di cellule che producono IFN- α/β , che sono coinvolte nell'insorgenza di tale patologia.

Esistono molte evidenze che confermano il ruolo di IFN-I tipo nell'evoluzione della SLE, come per esempio l'incremento del livello sierico di IFN- α in soggetti affetti da tale patologia (28); alcuni pazienti trattati con IFNs per varie condizioni cliniche, come infezioni virali croniche o tumori, mostrano l'insorgenza della SLE rispetto a pazienti controllo. Studi recenti di *microarray* hanno mostrato come nelle cellule del sangue periferico di soggetti affetti da SLE vi sia un incremento dell'espressione dei geni codificanti per IFN- α e IFN- γ , e che tale aumento di espressione è correlata in modo proporzionale con la severità della patologia (35). Inoltre IFN- α è stato recentemente identificato come il quel fattore presente nel sangue di soggetti affetti da SLE, in grado di far differenziare *in vitro* i monociti periferici in cellule dendritiche capaci di presentare l'antigene e indurre la morte cellulare (36).

Scopo del lavoro

L'IFN- α è un mediatore di notevole importanza della risposta immunitaria. Tale citochina è in grado di indurre la risposta innata, fornendo lo stimolo per l'attivazione e la formazione della risposta immunitaria acquisita.

Lo scopo principale di questo lavoro è determinare se e come IFN α è coinvolto nell'attivazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ T helper (Th) e valutare l'effetto dell'IFN- α sull'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ T regolatorie (Treg) murine.

I nostri risultati mostrano come IFN α promuova la produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th, quando stimolate in presenza di APC. Nonostante ciò, l'abilità di queste cellule nel rispondere allo stimolo proliferativo trasdotto da IL-2 viene inibito.

IL-2 è una citochina nota per essere stimolo proliferativo per le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Quando le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg vengono co-incubate in presenza di IFN α e IL-2, la proliferazione cellulare appare inibita. Inoltre IFN α sembra ridurre l'attività soppressoria delle cellule Treg.

In conclusione i nostri risultati dimostrano che IFN α agendo direttamente sulle cellule APC e riducendo l'attività delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sostengono e guidano l'attivazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th.

Materiali e metodi

1. Topi.

Sono stati utilizzati topi C57Bl/6J femmine di 8-12 settimane ottenuti da Charles River Laboratories (Calco, Italia). I topi IFNAR^{-/-} (KO) singenici di 8-12 settimane sono stati ottenuti da U. Kalinke.

I topi sono stati allevati presso lo stabulario dell'Università di Roma La Sapienza e istituto Superiore di Sanità in condizioni *pathogen-free*. Tutti i topi sono stati trattati come da accordi della Comunità Europea.

2. Anticorpi e reagenti.

I seguenti anticorpi e reagenti secondari (PE, FITC, APC, PE, Cy5 e biotinilati) sono stati acquistati dalla *BD Pharmingen*: anti-CD25, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3 ϵ , anti-CD28, anti-IL-2, anti-Ly6C, anti-IL-6, annessina V, ioduro di propidio (IP). IFN α è stato fornito dalla PBL, IL-2 dalla *BD Pharmingen*. L'anti- β -actina è stata ottenuta dalla *Sigma-Aldrich*, l'anti-IFN-AR α e l'anti-IFN-AR β sono stati acquistati dalla *Santa Cruz Biotechnology*.

3. Purificazione cellulare.

Tutte le sottopopolazioni cellulari sono state purificate mediante un sistema di biglie immunomagnetiche (Miltenyi Biotec). Gli splenociti sono stati lavati in soluzione salina e privati degli eritrociti mediante lisi osmotica. Le APC_s sono ottenute in seguito alla deplezione di cellule CD90⁺ usando biglie anti-CD90. Le T CD4⁺ sono state purificate usando un MACS MultiSort kit, mentre le cellule Treg CD4⁺ CD25⁺ sono state purificate marcando le CD4⁺ con un anticorpo anti-CD25 biotinilato e con biglie coniugate alla streptavidina. Le cellule ottenute, analizzate al citofluorimetro, risultano pure al 95% -99%.

4. Saggio di proliferazione.

Cellule di milza private delle cellule T e trattate con mitomicina C (5×10^4) usate come APC_s e cellule Th CD4⁺ CD25⁻ ($2,5 \times 10^4$), sono state coltivate in triplicato per 3 giorni in presenza di cellule Treg ($2,5 \times 10^4$) in piastre a fondo tondo da 96 pozzetti (*Cornig, Costar*) in terreno RPMI 1640 medium (GIBCO), supplementato con 10% FCS (GIBCO), glutammina (GIBCO), penicillina e streptomina (*BioWhittker*), 50 μ M 2-ME, e aminoacidi non essenziali (GIBCO), in presenza di 1 μ g/mL di un anticorpo anti-CD3 ϵ . Alla coltura è stato aggiunto 5×10^3 U/mL di IFN α o/e 5 ng/ml di IL-2.

La proliferazione dei linfociti è stata misurata mediante l'incorporazione di timidina triziata [³H]TdR (1 μ Ci/well) dopo 72 h di coltura utilizzando il Packard Matrix 96 Direct Beta Counter. Dove indicato le cellule CD4⁺CD25⁻ Th e le cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg sono state coltivate in piastre a 24 pozzetti codati precedentemente con anti-CD3 mAb (10 μ g/ml) per 2 ore a 37°C. Anti-CD28 mAb (1 μ g/ml) e IL-2 (10 ng/ml) sono stati utilizzati in forma solubile.

Il grado di soppressione esercitato dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th è espresso come 100 X [cpm delle CD4⁺CD25⁻ Th e delle CD4⁺CD25⁺ Treg]/cpm delle CD4⁺CD25⁻ Th]. La deviazione standard delle media è stata calcolata come descritto da Finney.

5. Analisi citofluorimetrica.

Dopo 3 giorni di co-coltura le cellule sono state raccolte, lavate e marcate con anticorpo anti-CD4, anti-CD3, anti-CD25, anti-Ly6C. In alcuni esperimenti la produzione di IL-2 è stata studiata mediante marcatura intracellulare: le cellule sono state lavate e stimulate con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) per 5 ore in presenza di brefeldina A (10 μ g/ml) (entrambi Sigma-Aldrich), per 4 ore.

Dopo essere state marcate con CD4 e CD25, le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA) 1% e permeabilizzate con saponina 0,5% e BSA 0,5% in PBS. La produzione citochinica è stata rilevata mediante

anticorpo monoclonale anti-IL-2. Un anticorpo isotipico è stato usato come controllo. Annessina V e ioduro di propidio sono stati utilizzati per analizzare la percentuale di morte cellulare. I campioni sono stati analizzati mediante un FACSCalibur (*Becton Dickinson*), utilizzando il programma *CellQuest* (*BD Biosciences*). Indice di proliferazione è stato valutato utilizzando il software *Fow Jo*.

6. Titolazione delle citochine.

Le seguenti citochine sono state titolate analizzando i sopranatanti delle colture mediante ELISA: IL-2 (*Endogen minikit*) e IL-6 (*R&D systems*). E' stata aggiunta Avidina perossidasi (*Sigma-Aldrich*) e successivamente il substrato ABTS (*Kirkegaard & Perry Laboratories*). L'assorbanza è stata misurata a 405 nm.

7. Wester blot

Le cellule sono state lisate per 10 minuti in ghiaccio in soluzione di lisi [MgCl_2 1 mM, NaCl 350 mM, HEPES 20 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 1 mM, PMSF 1 mM, apoproteina 1.5 mM, leupeptina 1.5 mM, cocktail di inibitori della fosfatasi II 1% (*SIGMA*), glicerolo 20%, Nonidet P-40 (NP-40) 1%]. Il sovranatante, ottenuto mediante una centrifugazione di 15 minuti a 11000 giri, è stato bollito per 10 minuti separato mediante SDS-PAGE al 12% e trasferito su membrana di nitrocellulosa (*Amersham Phar. Biotech*). I siti di legame aspecifici sono stati bloccati mediante un'incubazione *over night* con BSA 4% in PBS a 4°C, e successivamente la presenza della proteina è stata rilevata mediante incubazione con anti-IFNAR α e anti-IFNAR β per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, la membrana è stata lavata ed incubata con gli anticorpi secondari coniugati con alla fosfatasi alcalina. Il legame è stato rilevato mediante ECF e ECL (*Amersham Phar. Biotech*) secondo il protocollo del fornitore, e le immagini

acquisite mediante STORM 860 (Molecular Dynamics). L'intensità delle bande è stata quantificata mediante l'utilizzo del software Image QuaNT (Molecular Dynamics). I risultati sono mostrati dopo normalizzazione con β -actina.

8. Analisi statistica.

Gli esperimenti mostrati sono stati ripetuti almeno tre volte. Ogni valore rappresenta la media di 3 punti sperimentali, per i quali è stata calcolata la deviazione standard dalla media. Il T student e ANOVA sono stati utilizzati dove riportato. I simboli usati *= $p < 0.05$; ** = $p < 0.001$; n.s = non significativo.

Risultati

1. Analisi dell'espressione del recettore IFNAR sulle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th e CD4⁺ CD25⁺ Treg.

Il recettore di IFN- α/β è un eterodimero composto dalla subunità 1 (IFNAR1) e dalla subunità 2 (IFNAR2). Per studiare l'effetto di tale citochina sull'attivazione delle cellule T CD4⁺ abbiamo innanzitutto analizzato l'espressione cellulare delle due subunità recettoriali sulle cellule APC, CD4⁺ CD25⁻ Th e sulle CD4⁺ CD25⁺ Treg isolate dalla milza (spleniche) e dopo 48 ore di stimolazione antigenica policlonale. Le cellule così ottenute sono state lisate e successivamente analizzate mediante wester blot per l'espressione del recettore. Come mostrato in figura 1 l'espressione di IFNAR1 è maggiore nelle cellule APC e CD4⁺ CD25⁻ Th spleniche rispetto alle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg spleniche. Per quanto riguarda IFNAR2, tale subunità appare maggiormente espressa sulle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg spleniche. Dopo attivazione policlonale delle cellule invece, il livello di espressione di IFNAR1 sulle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th decresce sino ai livelli di espressione delle CD4⁺ CD25⁺ Treg, mentre anche l'espressione di IFNAR2 decresce sulle CD4⁺ CD25⁺ Treg attivate. Ciò dimostra che tutte e tre le popolazioni cellulari esprimono il recettore per IFN α/β , ma che l'espressione di questo viene modulata in modo differente in seguito all'attivazione cellulare.

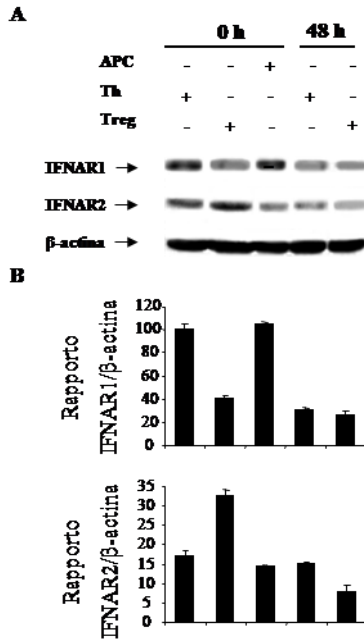


Figura 1. Analisi dell'espressione del recettore IFNAR sulle cellule $CD4^+CD25^-$ Th e sulle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg. Le cellule $CD4^+CD25^-CD69^-$ Th (Th) e le cellule $CD4^+CD25^+CD69^-$ Treg, (purificate mediante *sorting*) cellulare e le cellule APC, sono state coltivate per 48 ore in presenza di anti-CD3mAb (legato alla superficie della plastica alla superficie della piastra) anti-CD28 mAb solubile. A) Dopo lavaggio le cellule sono state lisate e le proteine estratte studiate mediante W.B. B) normalizzazione dei livelli di espressione di IFNAR1 e IFNAR2, mediante rapporto con l'espressione della β -actina.

2.Effetto di IFN α sull' attivazione delle cellule T CD4⁺ CD25⁻ Th.

Per valutare l'azione di IFN α sull'attivazione delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th, tale citochina è stata aggiunta in colture *in vitro*. Dopo la purificazione delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th, da topi IFNAR^{+/+} IFNAR^{-/-}, queste sono state messe in coltura in presenza degli stimoli anti-CD3 e anti-CD28 mAb, oppure APC e in presenza di IFN α a concentrazioni crescenti. Dopo tre giorni di coltura è stata analizzata la proliferazione cellulare e la produzione di IL-2.

In figura 2A, si osserva come IFN α sia in grado di inibire la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e la produzione di IL-2 in maniera dose dipendente. Nella figura 2B si può osservare come in presenza di APC la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th non venga inibita da parte di IFN α , e la produzione di IL-2 sia indotta dall'aggiunta della citochina in coltura. Come atteso IFN α non ha alcun effetto sulle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th IFNAR^{-/-}, usate come controllo (Fig 2A). Questo dato mostra la capacità di IFN α di attivare le cellule CD4⁺ CD25⁻ Th in presenza di APC, mediante un aumento produzione di IL-2. Tuttavia, non si osserva alcun effetto sulla proliferazione cellulare.

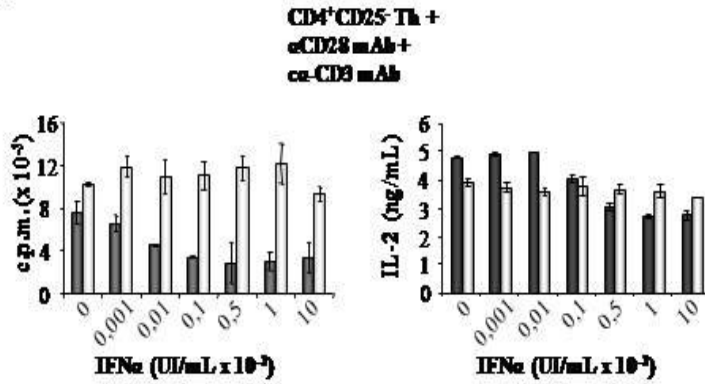
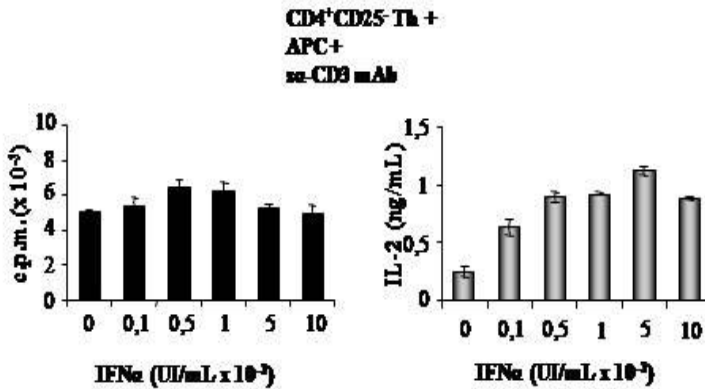
A**B**

Figura 2. Effetto di IFNα sulla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e la produzione di IL-2. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state coltivate in triplicato in presenza di anti-CD3mAb (α-CD3) con antiCD28 solubile (A) o in presenza di anti-CD3mAb solubile (α-CD3) e APC (B), con o senza l'aggiunta di IFNα, come riportato. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th IFNRA^{-/-} sono state usate come controllo (pannello A, istogramma bianco). La

proliferazione è stata valutata mediante l'incorporazione di [³H]TdR dopo 3 giorni di coltura, e misurata come cpm±SE. La concentrazione di IL-2 è stata rilevata mediante ELISA dei sovranatanti della coltura (pannello A e B a destra). Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti.

3. IFN α induce l'espressione di IL-2 senza induzione della proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th.

Per capire se IL-2 prodotta dalle cellule CD4⁺CD25⁻ Th in presenza di APC e IFN α abbia un effetto autocrino sulla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th, sono state allestite colture cellulari di CD4⁺CD25⁻ Th in presenza di APC IFN α e IL-2 aggiunte alla coltura singolarmente o in combinazione e dello stimolo policlonale anti-CD3. Le cellule sono state studiate per proliferazione cellulare e produzione di IL-2 dopo 15, 40 e 63 ore di incubazione. Come si vede in figura 3A l'aggiunta di IFN α diminuisce ma non inibisce la proliferazione delle cellule Th, mentre come aspettato l'aggiunta di IL-2 induce proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th (Fig.3A e B), proliferazione che viene invece inibita quando si aggiunge anche IFN α alla coltura. L'analisi del sovranatanti di queste colture cellulari, mediante ELISA, mostra come IFN α induca una maggiore produzione di IL-2 che però non agisce in termini di proliferazione cellulare sulle CD4⁺ CD25⁻ Th (Fig. 3B). La produzione di IL-2 a livello intracellulare, è stata eseguita sulle stesse colture cellulari e ha mostrato come la presenza di IFN α nel mezzo induca precocemente (15 ore) una elevata produzione di IL-2 sia in termini di cellule IL-2⁺ (Fig. 3C) sia in termini di media di fluorescenza (Fig. 3D). IFN α è in grado di aumentare la produzione di IL-2 anche quando aggiunto in presenza di IL-2 esogena (Fig. 3C e D). Nello stesso esperimento abbiamo studiato anche l'espressione cellulare sulle CD4⁺ CD25⁻ Th di CD25 di cui IFN α , induce e sostiene l'espressione (Fig. 3C).

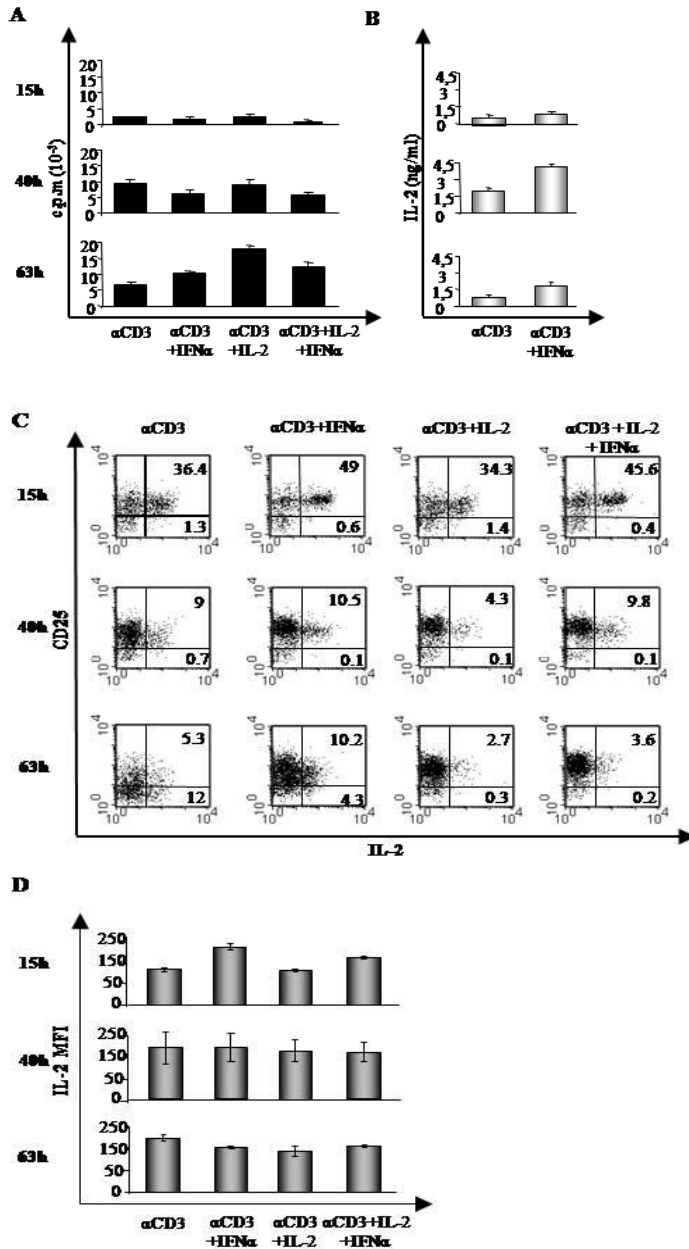


Figura 3. Analisi della cinetica di proliferazione e produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th in presenza di IFN α e IL-2 esogena. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sono state coltivate per tre giorni in presenza di α CD3 e APC in presenza o assenza di IFN α o della combinazione IFN α e IL-2. La proliferazione è stata determinata dopo 15, 40, 63 ore mediante incorporazione di [³H]TdR e misurata come cpm \pm SE (pannello A, a sinistra). IL-2 è stata rilevata mediante ELISA agli stessi intervalli di tempo (pannello B, a destra). Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th coltivate come descritto sopra sono state stimulate con ionomicina e PMA per 5 ore a 37°C. Le cellule sono state raccolte e marcate con anti-CD25 e anti-IL-2 mAb per studiarne l'espressione mediante citofluorimetria. La percentuale delle cellule CD25⁺ IL-2⁺ e CD25⁻ IL-2⁺ sono riportate nel pannello C, mentre la MFI nel pannello D. I pannelli A, B, C risultano dalla media di 4 esperimenti indipendenti.

4. Le cellule APC IFNRA^{+/+} sono necessarie per la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ in presenza di IFN α

I risultati precedenti mostrano come IFN α sia in grado di inibire la proliferazione delle cellule CD4⁺ CD25⁻ Th, nonostante ne attivi la produzione di IL-2. Poiché non è possibile capire se tale effetto sia diretto su tali cellule oppure se IFN α agisca sulle Th in modo indiretto mediante le APC presenti nella coltura cellulare, abbiamo allestito colture con cellule CD4⁺ CD25⁻ Th e APC purificate sia da topi IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-}, in presenza o assenza di IFN α . Si noti come le cellule CD4⁺ CD25⁻ Th IFNAR^{-/-} quindi non in grado di trasdurre il segnale di IFN α , in presenza delle APC wt siano in grado di proliferare maggiormente rispetto al controllo (Fig. 4A). L'analisi mediante ELISA dei sovranatanti di queste colture cellulari mostra come IFN α sia in grado di indurre la produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th solo in presenza di APC IFNAR^{+/+}, confermando il ruolo chiave di queste cellule nell'attivazione delle CD4⁺CD25⁻ Th mediata da IFN α . IL-2 è una citochina molto importante in quanto agisce come fattore di crescita per le cellule del sistema immunitario. Principalmente, IL-2 è coinvolta nella generazione e nel mantenimento delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Queste cellule che si dimostrano anergiche *in vitro* riacquistano la capacità proliferativa quando nel mezzo di coltura viene aggiunta IL-2 (37). Abbiamo voluto studiare gli effetti di IFN α sulla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg quando nel mezzo è presente IL-2. Come mostrato in figura 4B IL-2 aggiunta da sola nel mezzo di coltura è in capace di attivare la proliferazione sia delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sia delle CD4⁺CD25⁻ Th. L'aggiunta di IFN α invece riduce la proliferazione indotta da IL-2 per entrambe le sottopopolazioni cellulari.

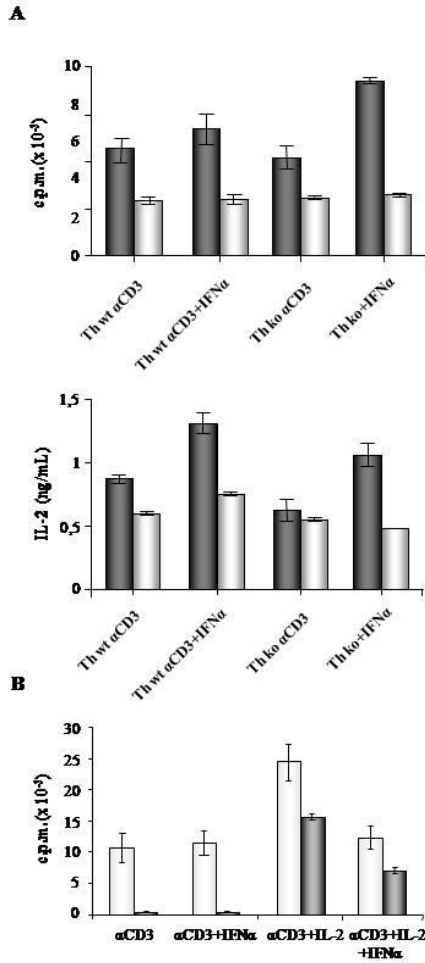


Figura 4. IFN α inibisce la proliferazione delle cellule Th. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺ CD25⁺ Treg IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} sono state coltivate in presenza o assenza di IFN α e in presenza di APC IFNAR^{+/+} (istogramma nero) e APC IFNAR^{-/-} (istogramma bianco) e analizzate per la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e la produzione di IL-2, dopo 3 giorni di coltura (A). Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th (istogramma grigio) e CD4⁺CD25⁺ Treg (istogrammi bianco) sono state stimulate in presenza di APC e α -CD3 mAb, in presenza e in assenza di

IFN α o IL-2, oppure entrambe gli stimoli (B). La proliferazione è stata determinata a 3 giorni mediante incorporazione di [^3H]TdR misurata come cpm \pm SE.

5. IFN α non influenza la vitalità delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg.

Abbiamo voluto escludere un eventuale effetto tossico di IFN α sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg. A tal fine le cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg sono state attivate per 3 giorni in presenza di anti-CD3 mAb e APC in presenza e in assenza di IFN α , e successivamente marcate con Annessina V (An V) e ioduro di propidio (PI) per studiarne la morte precoce e tardiva, mediante citofluorimetria. Come mostrato in figura 5, l'aggiunta di IFN α non interferisce con la sopravvivenza cellulare di entrambe le popolazioni.

	AN ⁺ IP ⁻	AN ⁺ IP ⁺	AN ⁻ IP ⁺
Th ctrl	7,4 ± 0,20	8,8 ± 3,90	1,2 ± 0,05
Th + IFNα	8,3 ± 0,75	5,8 ± 2,85	1,3 ± 0,01
Treg ctrl	4,8 ± 1,08	2,2 ± 0,73	10,5 ± 0,47
Treg + IFNα	5,3 ± 0,21	3,8 ± 1,17	8,4 ± 4,49

Figura 5. Ruolo di IFN α nella sopravvivenza delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg sono state stimulate con α -CD3 mAb in presenza di APC (ctrl) o in presenza di IFN α . Dopo 72 ore di coltura le cellule sono state marcate con CD4 e CD3 mAb, annessina (AN) V e PI. La percentuale delle cellule AN⁺PI⁻, AN⁺PI⁺ e morte AN⁻PI⁺, sono state determinate sul *gate* CD4⁺CD3⁺ mediante citofluorimetria.

6. IFN- α induce l'espressione del CD25 e di Ly6C sulle cellule CD4⁺CD25⁻.

Per meglio capire l'azione dell'IFN α sull'inibizione della proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th in presenza di IL-2, siamo andati ad analizzare, mediante citofluorimetria, se esistano variazioni dell'espressione del CD25 (catena α del recettore di IL-2) sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Entrambe le popolazioni cellulari sono state purificate e messe in coltura con APC e lo stimolo policlonale anti-CD3, in presenza o assenza di IFN α . A determinati intervalli di tempo, le cellule sono state lavate e marcate con l'anticorpo monoclonale per CD25. Dai risultati mostrati in figura 6 A e B si può notare come mentre per le CD4⁺CD25⁺ Treg la presenza o l'assenza di IFN α aggiunto al mezzo di coltura non fa variare né la percentuale di cellule CD25⁺, né la MFI, per le cellule CD4⁺CD25⁻ Th l'aggiunta di IFN α comporta un aumento significativo sia delle cellule CD25⁺ sia un aumento della MFI. Questo dimostra non solo che IFN α è in grado di attivare un' aumentata espressione del CD25 sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th, ma anche che la citochina è in grado di mantenere un' elevata espressione del recettore sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th al trascorrere del tempo. Questo risultato indica che la mancata risposta proliferativa delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th data dallo stimolo mediato da IL-2 in presenza di IFN- α , non può essere attribuito ad un' inibizione dell'espressione del CD25, suggerendo dunque che esistano altri meccanismi.

Come controllo abbiamo anche studiato l'attivazione e l'induzione dell'antigene di memoria Ly6C la cui espressione viene specificatamente indotta sulle cellule T dagli INF I tipo (38, 39). Inoltre per escludere un coinvolgimento nell'espressione dei marcatori CD25 e Ly6C delle cellule APC, le colture cellulari sono state allestite anche sostituendo le APC con lo stimolo CD28 adesivo alla plastica dei pozzetti della piastra di coltura, e dall'anti-CD3 solubile. Dall'analisi dei risultati, mostrati in figura 6C, si evince che IFN α è capace di indurre l'espressione del CD25 e di Ly6C sulle cellule

CD4⁺CD25⁻ Th sia in presenza sia in assenza delle APC, dimostrando l'esclusivo coinvolgimento della citochina nell'attivazione dei marcatori.

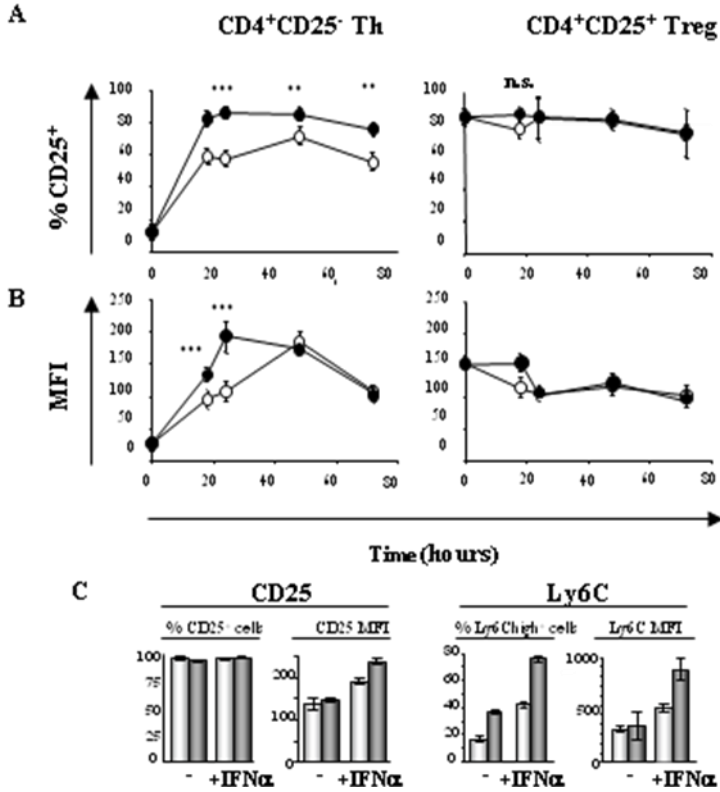


Figura 6. IFN α induce l'espressione del CD25 e Ly6C sulle cellule CD4⁺CD25⁻. Le cellule CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ sono state purificate e coltivate in presenza di anti-CD3 e APC e in assenza (cerchio vuoto) o presenza (cerchio pieno) di IFN α . A vari intervalli di tempo le cellule sono state raccolte e marcate per lo studio delle percentuale (pannello A) e MFI (pannello B) di cellule CD25⁺. Le cellule CD4⁺CD25⁻ sono state coltivate per 36 ore in presenza di α -CD3 e α -CD28 (istogramma bianco) oppure con APC e α -CD3 (istogramma grigio) in presenza o assenza di IFN α , e analizzate mediante analisi citofluorimetrica per l'espressione del CD25 e Ly6C. Risultati ottenuti con la media di tre esperimenti indipendenti.

7. IFN α incrementa l'espressione del CD25 e di Ly6C sulle cellule CD4⁺ *naive*.

Nell'esperimento precedente abbiamo dimostrato che IFN α è capace di indurre una maggiore espressione del CD25 sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Th. Poiché l'espressione del recettore IFNRA viene espresso dalle cellule in base al loro stato di attivazione, abbiamo voluto studiare se esistano differenti proprietà funzionali dell'espressione del recettore sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Th *naive* rispetto alle cellule CD4⁺CD25⁺ Th attivate (blasti), mediante l'analisi dell'espressione del CD25. Le cellule CD4⁺CD25⁺Th *naive* e cellule CD4⁺CD25⁺ Th attivate mediante preattivazione con gli stimoli per 36 ore, sono state messe in coltura in presenza o in assenza di IFN α in presenza di APC e anti-CD3 mAb. Dopo 36 ore di coltura entrambe i tipi cellulari sono stati raccolti lavati e marcati con monoclonali specifici per CD25 e Ly6C. I risultati in figura 7 A e B, mostrano che l'aggiunta di IFN α nel terreno di coltura induce una maggiore espressione di entrambe i marcatori, sia sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Th *naive* sia sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Th attivate. Inoltre si noti come in presenza di IFN α venga incrementata la percentuale di cellule CD4⁺ Ly6C^{high}Th (Fig.7B). Nonostante ciò, l'aumento dell'espressione del CD25 su i blasti (MFI 100) rispetto all'espressione del CD25 dei blasti di controllo (MFI 65) risulta meno evidente rispetto all'espressione del CD25 sulle cellule CD4⁺ *naive* (MFI 220; Fig 7 A). Dunque l'effetto di IFN α è maggiore sulle cellule CD4⁺ *naive*, e l'incremento dell'espressione sia del CD25 sia Ly6C necessita di una prolungata esposizione alla citochina.

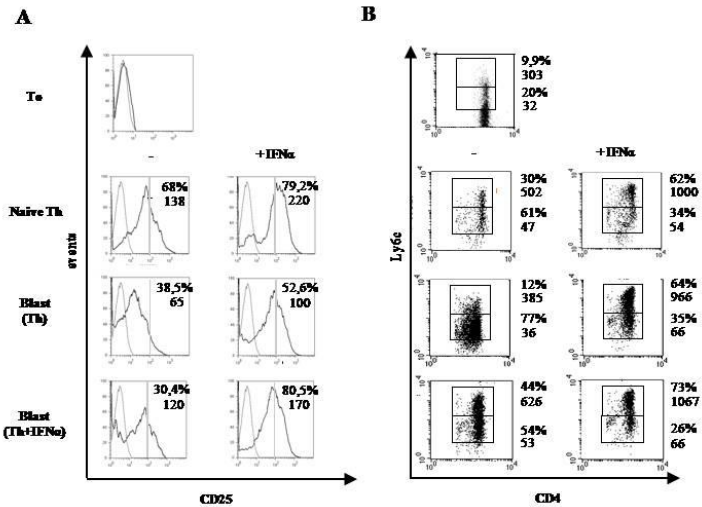


Figura 7. Effetto di IFN α sulle cellule CD4⁺CD25⁻ naive e blasti CD4⁺CD25⁺ Th. Le cellule CD4⁺CD25⁻ naive o blasti CD4⁺CD25⁺ Th, (attivate precedentemente in presenza di APC e con gli stimoli α -CD3 da solo o in presenza di IFN α per 36 ore) sono state coltivate con APC α -CD3, più o meno IFN α per 36 ore. Finita l'incubazione le cellule sono state raccolte e studiate per l'espressione di CD25 e di Ly6C, nel gate delle cellule CD4⁺CD3⁺. I risultati sono espressi in percentuale e in MFI (indicata sotto la percentuale) di CD25⁺ e Ly6C⁺.

8.Effetti dell'IFN α sull'inibizione indotta dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

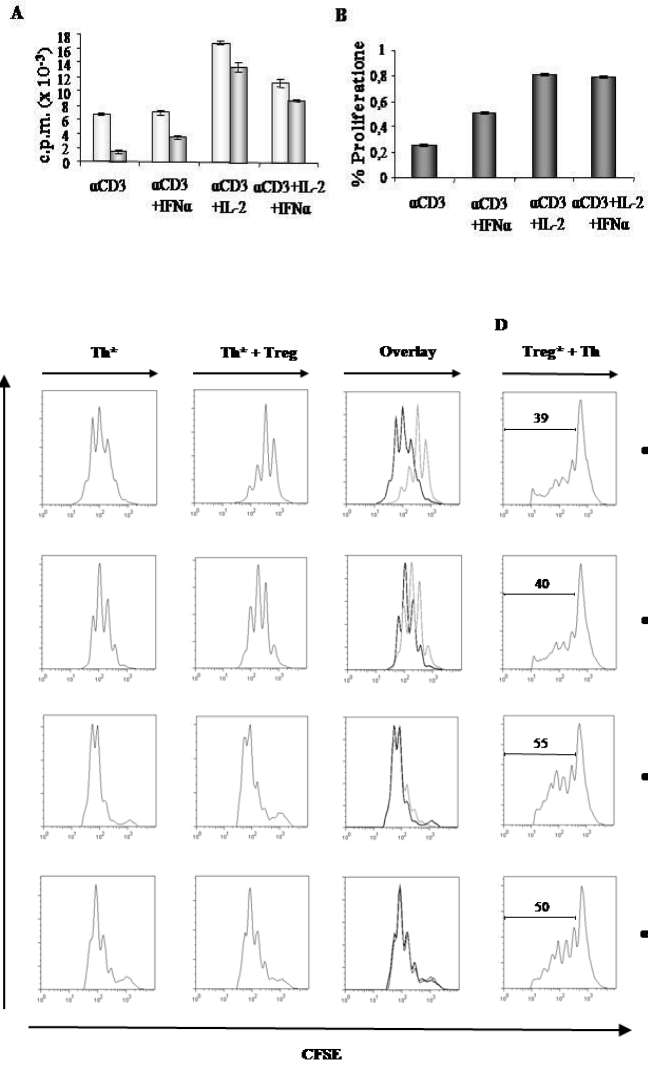
Come mostrato in precedenza, abbiamo osservato che IFN α non influenza l'espressione del CD25 sulle cellule Treg. Quindi abbiamo voluto capire se la citochina sia capace di interferire con l'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. L'attività soppressoria delle Treg è stata misurata in termini di inibizione della proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e della produzione di IL-2, in colture cellulari in presenza e in assenza di IFN α . Come mostrato in figura 8 (A e B), quando le cellule CD4⁺CD25⁻ Th vengono incubate in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, la proliferazione cellulare è fortemente inibita; mentre quando IFN α è aggiunto al terreno di coltura la proliferazione totale è circa il doppio rispetto al controllo. Come già noto dalla letteratura (40, 41), l'aggiunta di IL-2 alla coltura porta a un incremento della proliferazione. L'aggiunta contemporanea di IFN α e IL-2 invece, non comporta un ulteriore incremento della proliferazione cellulare.

Poiché la soppressione esercitata dalle Treg è misurata in termini di c.p.m mediante l'incorporazione della timidina triziata ([³H]TdR) dopo 72 ore di coltura cellulare, è impossibile distinguere il contributo reale alla proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg. Per questo abbiamo deciso di marcare le due popolazione in modo alternato, con il CFSE (marker di divisione cellulare) prima della coltura cellulare in modo da seguire il destino di ogni popolazione al citofluorimetro.

In figura 8 C, si nota come la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th venga inibita in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, mentre l'aggiunta di IL-2 induca la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th che risultato protette dall'azione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. La proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th incubate con le cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza di IFN α è maggiore se confrontata con la coltura di controllo. Questo risultato conferma quello precedente ottenuto dall'analisi della proliferazione totale valutata mediante c.p.m, infatti

l'analisi del CFSE mostra un'inibizione dell'attività soppressoria delle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg in presenza di $IFN\alpha$ (Fig. 8 C, E). Inoltre si dimostra che quando $IFN\alpha$ è aggiunto alla coltura insieme a IL-2, $IFN\alpha$ non interferisce con il blocco della soppressione esercitato da IL-2.

E' stata analizzata anche la proliferazione delle Treg in queste colture, marcando le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg con CFSE (Fig. 8 D) e coltivandole in presenza o assenza di $IFN\alpha$ o IL-2 o entrambe gli stimoli. In presenza di $IFN\alpha$ la proliferazione delle Treg è simile al controllo.



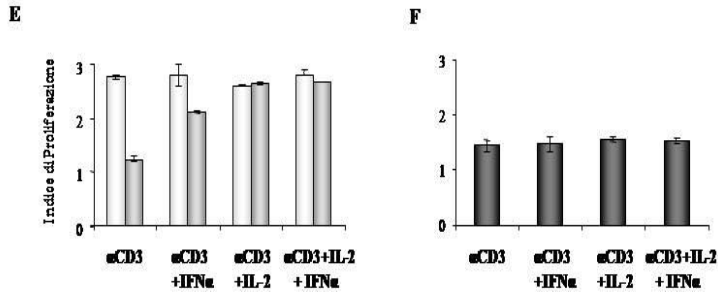


Figura 8. Effetto di IFN α sull'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th da sole (istogramma bianco) o coltivate in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (istogramma grigio) sono state stimolate con APC e α -CD3 mAb, in presenza di IFN α o IL-2 o entrambe gli stimoli per 72 ore. La proliferazione cellulare è stata studiata mediante l'incorporazione di [³H]TdR (A). I risultati sono stati espressi anche come percentuale di proliferazione delle cellule T (B). Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th da sole o coltivate in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sono state stimolate con APC e α CD3 mAb, in presenza di IFN α o IL-2 o entrambe gli stimoli per 72 ore. Il simbolo * indica che le cellule sono state marcate prima della coltura con CFSE (Th* pannello C, Treg* pannello D). La terza colonna del pannello C mostra la sovrapposizione (*overlay*) del profilo delle cellule CFSE⁺ Th coltivate da sole (istogramma nero) o in presenza di Treg (istogramma grigio). La proliferazione è stata valutata secondo la diluizione del CFSE. L'indice di proliferazione delle le cellule Th (Th da sole, istogramma bianco; Th più Treg istogramma grigio) e delle cellule Treg è mostrata nel pannello E ed F, rispettivamente.

9. IFN α inibisce la produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg.

Abbiamo studiato la produzione di IL-2 nei sovranatanti delle colture mostrate in Fig 8. L'aggiunta di IFN α alla coltura incrementa la produzione di IL-2 sia in assenza che in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (Fig 9 A pannello). Nonostante in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg l'induzione di IL-2 da parte di IFN α risulti parzialmente ridotta rispetto alle sole cellule CD4⁺CD25⁻ Th in presenza di IFN α , la percentuale di inibizione della produzione di IL-2 mostrata nella figura 9 B evidenzia che in presenza della citochina l'inibizione è minore rispetto al controllo. Questo dimostra che IFN α inibisce la soppressione indotta dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sia in termini di proliferazione (Fig 8) sia in termini di produzione di IL-2.

Poiché è noto che IFN α induce la produzione di IL-6, citochina nota per la sua attività inibitoria sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (21), abbiamo studiato la produzione di questa citochina sugli stessi sovranatanti cellulari. Come si mostra in Figura 10 D, IFN α induce la produzione di IL-6, che però in presenza di delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg è fortemente ridotta.

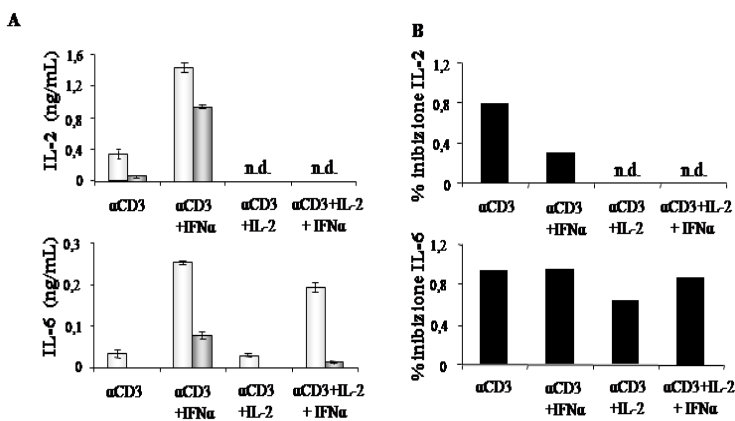


Figura 9. Studio dell'effetto di IFN α sull'inibizione della produzione di IL-2 e IL-6 delle cellule Treg. Le cellule CD4⁺CD25⁻ Th da sole (istogramma bianco) o coltivate in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (istogramma grigio) sono state stimulate con APC e α -CD3 mAb, in presenza di IFN α o IL-2 o entrambe gli stimoli per 72 ore. La produzione di IL-2 e IL-6 sono state studiate mediante ELISA sui sovranatanti delle colture cellulari. La percentuale di inibizione di produzioni delle citochine è mostrata nel pannello B. I dati sono la media di tre esperimenti separati.

10. Distribuzione della popolazione CD4⁺ CD25⁻ Th e CD4⁺ CD25⁺ Treg in topi IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-}

Poiché tutti i tipi cellulari coinvolti nella co-coltura esprimono IFNAR, non è possibile predire quale sia il bersaglio cellulare dell'azione di IFN- α nel blocco della soppressione delle cellule Th mediato dalle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg. Per tali considerazioni, sono state allestite co-culture utilizzando cellule provenienti da topi IFNAR^{+/+} IFNAR^{-/-}, allo scopo di chiarire il meccanismo con cui l'IFN- α interferisce con la soppressione mediata dalle cellule CD4⁺ CD25⁺ Treg. Dalla letteratura è noto che i topi IFNAR^{-/-} non presentano anomalie in termini di espressione del CD3, CD4, CD8 e MHC di classe I e II nelle popolazioni di timociti e splenociti. Soltanto le IgM appaiono debolmente ridotte nel topo mutante (42). Al fine di isolare le cellule Treg da animali IFNAR^{-/-}, è stata analizzata la distribuzione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in vari organi linfatici primari e secondari. A tale scopo sono stati isolati da topi IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} il timo, i linfonodi e la milza. I linfociti ottenuti da questi organi sono stati analizzati al citofluorimetro per l'espressione dei marcatori CD8, CD4, CD25 e Foxp3. I risultati della figura 10 mostrano che le cellule Treg differenziano regolarmente nel timo dei topi IFNAR^{-/-} e la distribuzione delle cellule Treg periferiche è simile tra i topi IFNAR^{-/-} e i topi di controllo.

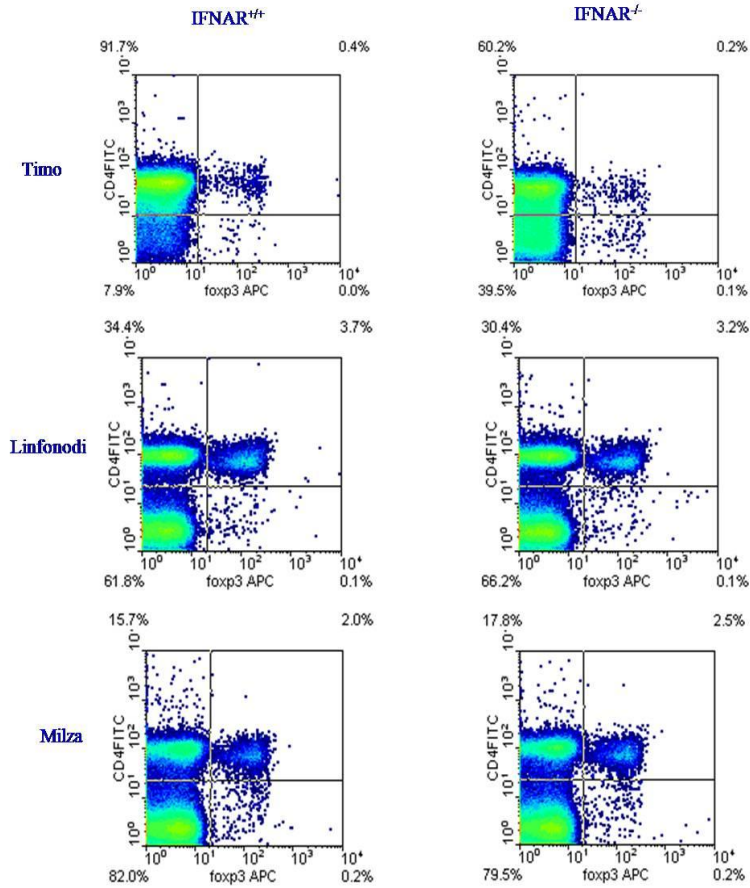
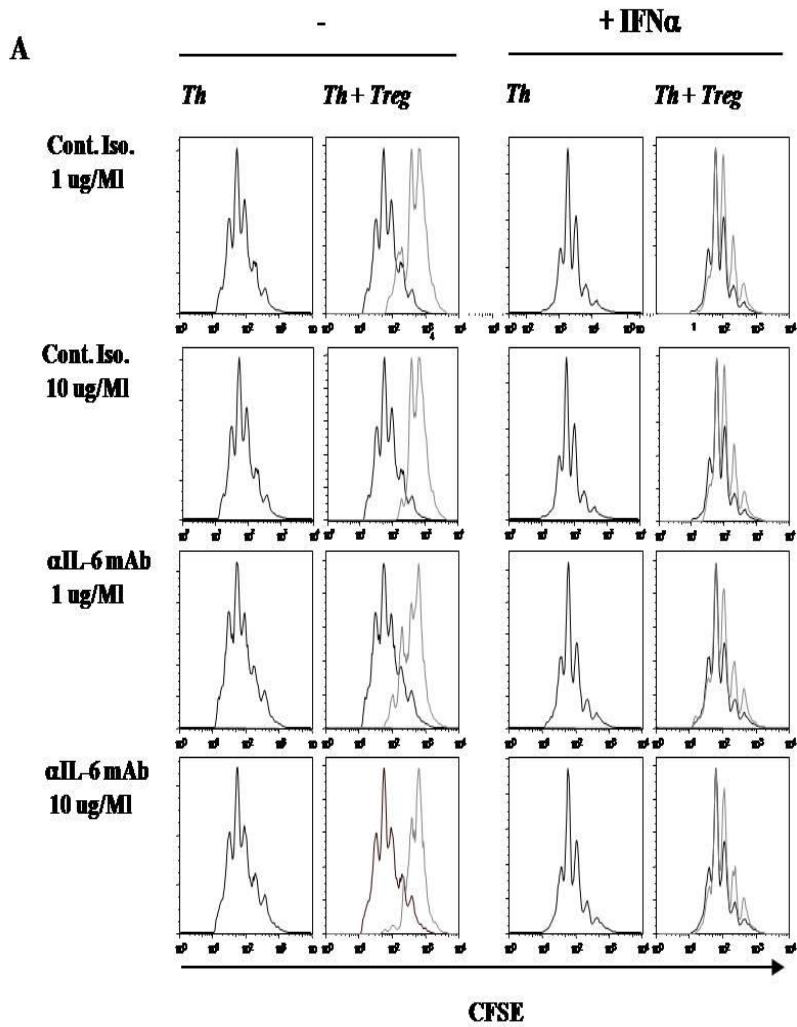


Figura 10. Analisi della distribuzione della popolazione CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg in topi IFNRA^{+/+} e IFNRA^{-/-}. Timo, milza e linfonodi sono stati prelevati da topi IFNRA^{+/+} e IFNRA^{-/-}. Le cellule ottenute da questi organi sono state marcate con anti-CD4-FITC e anti-FOXP3-APC; la distribuzione e la percentuale delle sottopopolazioni è stata utilizzata mediante citofluorimetria.

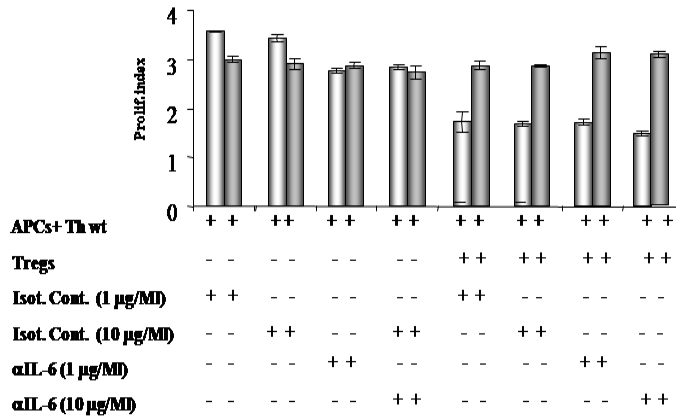
11.IL-6 non è coinvolta nell'inibizione dell'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg indotta da IFN α .

Per escludere un possibile ruolo di IL-6 nel blocco dell'inibizione delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza di IFN α , abbiamo deciso di aggiungere al saggio di soppressione un anticorpo monoclonale bloccante IL-6 prodotta in coltura. La Figura 11 mostra che il blocco di IL-6, mediante l'aggiunta di anti-IL-6 mAb alla coltura di CD4⁺CD25⁺ Treg e CD4⁺CD25⁻ Th non inibisce il blocco della soppressione esercitato sulle CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza di IFN α (Fig.11 A e B).

L'analisi dei sovrantanti di questa coltura, mostra invece come la presenza di IL-6 sia necessaria per la produzione di IL-2. Infatti l'aggiunta di anti-IL-6 mAb alla coltura porta a una drastica riduzione di IL-2 prodotta, anche in presenza di IFN α . Ciò dimostra che sebbene IL-6 non sia coinvolta nel blocco della soppressione delle CD4⁺CD25⁺ Treg in presenza di IFN α , la sua presenza è strettamente necessaria per la produzione di IL-2 indotta da IFN α (Fig. 11C).



B



C

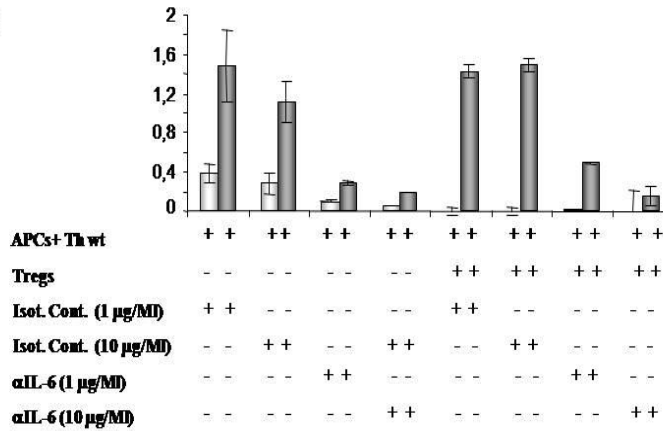


Figura 11. IL-6 non è coinvolta nel blocco della soppressione indotta da IFN α . Le cellule CD4⁺CD25⁻ CFSE⁺ Th da sole (istogramma nero) o le cellule CD4⁺CD25⁻ CFSE⁺ Th coltivate in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (istogramma grigio),

sono state stimulate con APC e α CD3 mAb in presenza o assenza di IFN α , e in presenza di anticorpi bloccanti IL-6 (α IL-6) oppure dell'isotipo di controllo (Isot.Cont). Le colture, incubate per 72 ore sono state analizzate citofluorimetricamente. Nel profilo di sovrapposizione del CFSE, la proliferazione delle cellule Th coltivate da sole sono indicate dall'istogramma nero, mentre la proliferazione delle Th coltivate in presenza delle Treg è mostrato dall'istogramma grigio (A). L'indice di proliferazione delle cellule Th è stato valutato secondo la diluizione del CFSE, come mostrato nel pannello A, (B). La produzione di IL-2 (pannello C) è stata valutata mediante ELISA sui sovrantanti della coltura di sole Th (istogramma bianco) oppure di Th coltivate in presenza di Treg (istogramma grigio). I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

12. L'inibizione della soppressione necessita dell'espressione di IFNAR sia sulle APC che sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg .

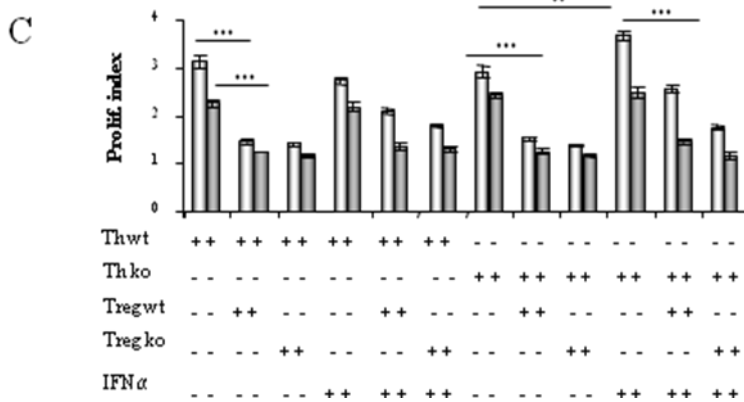
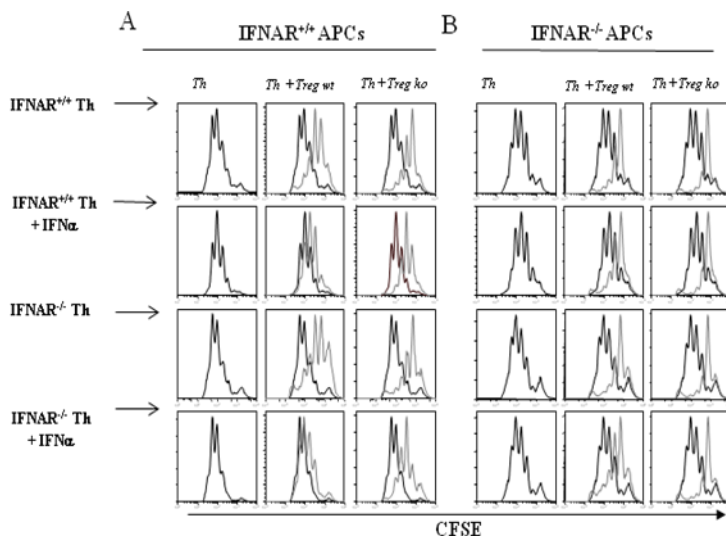
L'esperimento precedente dimostra che IFN α è in grado di inibire l'attività soppressoria esercitata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg su le cellule T CD4⁺ attivate. Poiché le cellule delle colture precedenti esprimono tutte IFNAR, non siamo in grado di definire con chiarezza quale cellula sia esattamente il bersaglio mediante il quale IFN α svolge la sua attività. Per questo sono state allestite delle colture con cellule APC, CD4⁺CD25⁺ Treg, CD4⁺CD25⁻ Th purificate da splenociti provenienti sia da topi IFNAR^{+/+} sia da topi IFNAR^{-/-}. Quindi i diversi tipi cellulari, IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} sono stati combinati fra di loro, in presenza o in assenza di IFN α per capire quale sia il bersaglio della citochina. Inoltre per seguire la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th, queste sono state marcate con il CFSE.

I risultati mostrati in Figura 12 A mostrano la proliferazione analizzata al citofluorimetro mediante incorporazione del CFSE delle cellule Th IFNAR^{+/+} e IFNAR^{-/-} con o senza IFN α aggiunto nel mezzo, in presenza di APC IFNAR^{+/+} e con cellule CD4⁺CD25⁺ Treg sia IFNAR^{+/+} che IFNAR^{-/-}. In assenza di IFN α la proliferazione delle Th è fortemente ridotta a causa dell'azione soppressiva delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, che mantengono la loro funzione anche se provenienti da IFNAR^{-/-}. La presenza di IFN α invece protegge le cellule CD4⁺CD25⁻ Th sia IFNAR^{+/+} sia IFNAR^{-/-}, dalla soppressione esercitata dalle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, in presenza di APC IFNAR^{+/+}.

Quando invece vengono utilizzate APC IFNAR^{-/-} (Fig. 12 B) l'effetto protettivo esercitato da IFN α non si osserva più, infatti la proliferazione delle Th è ridotta sempre, in presenza di cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Quindi è chiaro che l'effetto protettivo di IFN α dell'inibizione della

soppressione esercitata dalle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg è mediata dalle APC. Per meglio definire il ruolo svolto da $IFN\alpha$, abbiamo studiato la produzione di IL-2 nei supernatanti delle colture precedenti (A e B). I risultati della Figura 12 D, mostrano che la produzione di IL-2 indotta da $IFN\alpha$ è strettamente legata all'espressione di IFNAR sulle APC, infatti tale effetto è ridotto quando in coltura sono presenti le APC $IFNAR^{-/-}$. I risultati confermano, quindi che in presenza di APC $IFNAR^{+/+}$ e $IFN\alpha$, la produzione di IL-2 subisce un incremento considerevole, e che l'aggiunta alla coltura delle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg $IFNAR^{+/+}$ riduce solo lievemente la produzione di IL-2. Inoltre le cellule $CD4^+CD25^+$ Treg $IFNAR^{-/-}$ sono capaci di inibire sempre la produzione di IL-2 in presenza delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th $IFNAR^{+/+}$ e $IFNAR^{-/-}$.

Tutti i risultati quindi, dimostrano che $IFN\alpha$ è capace di bloccare l'attività soppressoria delle cellule $CD4^+CD25^+$ Treg sulla proliferazione delle cellule $CD4^+CD25^-$ Th, esercitando la sua azione sulle cellule APC.



D

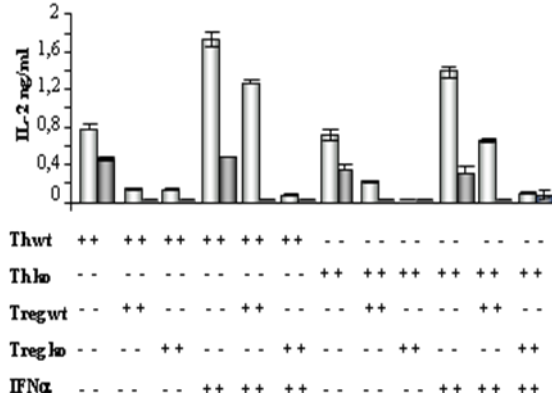


Figura 12. IFN α agisce sia sulle cellule APC sia sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Le cellule CD4⁺CD25⁺ Th purificate sia da topi IFNAR^{+/+} che IFNAR^{-/-}, marcate con CFSE sono state coltivate in presenza e in assenza di IFN α (come descritto) e in assenza (colonna di sinistra) o in presenza di Treg IFNAR^{+/+} (colonna di mezzo) oppure di Treg IFNAR^{-/-} (colonna a destra). Dopo tre giorni di coltura le cellule sono state analizzate in citofluorimetria. Nel profilo di sovrapposizione del CFSE, le cellule Th coltivate da solo (controllo) sono rappresentate dall'istogramma nero, mentre le cellule Th coltivate con le Treg dall'istogramma grigio. Le co-culture sono state combinate con APC IFNAR^{+/+} (A), oppure con APC IFNAR^{-/-} (B). L'indice di proliferazione è stato valutato dalla diluizione del CFSE. I dati sono il risultato di tre esperimenti indipendenti. La produzione di IL-2 è stata misurata mediante ELISA sui sovranatanti della coltura. Le colture in presenza di APC IFNAR^{+/+} sono mostrate in istogramma bianco, quelle con APC IFNAR^{-/-} in istogramma grigio. I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Discussione

Molti studi indicano che gli INF-I tipo possano agire come adiuvanti della risposta immunitaria, come per esempio nel *cross-priming* esercitato sulle DC, la generazione delle risposta delle cellule T CD8⁺ e la produzione di anticorpi (43, 44). Mentre molto si sa dell'azione di IFN α sull'attivazione delle cellule T CD8⁺ (43, 44), poco si sa circa gli effetti immunomodulatori della citochina sulle cellule T CD4.

Il presente studio ha come scopo quello di meglio capire il ruolo di IFN α sull'attivazione e funzione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg.

L'azione di IFN α sulla proliferazione delle cellule T CD4⁺ mostra la complessità dell'azione immunoregolatrice di questa citochina. Infatti molti autori riportano che IFN α inibisce la proliferazione delle cellule T CD4⁺ (45, 46).

In questo lavoro dimostriamo che IFN α , in presenza delle cellule APC (*presenting antigen cells*) attiva le cellule T CD4⁺ mediante induzione dell'espressione del CD25 (catena α del recettore di IL-2) e Ly6C (*marker memory*) e la produzione di IL-6 e IL-2. Nonostante questo, l'aggiunta di IFN α inibisce il segnale proliferativo di IL-2. Quindi, sebbene IFN α aumenti, in presenza delle APC, la produzione endogena di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺, allo stesso tempo riduce la sensibilità di queste cellule verso l'induzione proliferativa esercitata da IL-2.

Gli effetti inibitori esercitati da IFN α sul blocco del segnale proliferativo da parte di IL-2, è molto importante per la omeostasi delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg, che sono dipendenti da IL-2 per l'attività proliferativa (47).

Sebbene IFN α inibisce il segnale proliferativo indotto da IL-2, questa citochina aumenta l'espressione del CD25 sulle cellule CD4⁺. Questo dato indica che

nonostante che la magnitudo dell'espansione clonale sia ridotta, viene potenziato il segnale di IL-2 mediante l'espressione del CD25 sulle cellule CD4⁺. Di conseguenza possiamo supporre che IFN α induca la produzione di IL-2, e che il segnale mediato da IL-2 non è strettamente coinvolto con la proliferazione delle cellule CD4⁺, ma possa svolgere un ruolo di attivazione verso altre cellule, come per esempio le DC, le cellule CD8⁺ e l'attività delle cellule NK effettrici, nonché sull'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg (48). Quindi l'effetto che IFN α esercita sulle cellule CD4⁺ nella produzione di IL-2 potrebbe essere importante per l'attivazione della risposta immunitaria. Infatti i nostri risultati mostrano come IFN α induca e sostenga l'espressione del marcatore di memoria Ly6C sulle cellule CD4⁺. Nonostante questo, ulteriori ricerche sono necessarie per comprendere il meccanismo d'azione di IFN α e l'istaurarsi della risposta immunitaria precoce e il successivo sviluppo della risposta *memory*.

Il presente studio mette in luce il duplice effetto di IFN α sulle cellule CD4⁺: indurre la produzione di IL-2 e interferire con l'attività soppressoria delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Quando IFN α è aggiunto al saggio di soppressione, i risultati mostrano un decremento dell'attività soppressiva delle Treg, che si manifesta con la proliferazione delle cellule CD4⁺CD25⁻ Th associata alla produzione di IL-2. I nostri risultati mostrano che questo effetto è dovuto ad una azione indiretta dell'IFN α sulle cellule APC, infatti questo effetto viene completamente perso se le cellule APC vengono purificate da topi IFNAR^{-/-}. Sebbene abbiamo identificato il target cellulare nel blocco della soppressione esercitata dalle Treg, i meccanismi molecolari che IFN α attiva rimangono da chiarire.

Il nostro studio, mostra anche che la produzione di IL-2 è dipendente da IL-6. Tale relazione è già stata osservata in topi IL-6^{-/-} (49). IL-6, insieme ad altre citochine che attivano i TRL, è in grado di proteggere le cellule CD4⁺CD25⁻ Th dalla soppressione esercitata dalle CD4⁺CD25⁺ Treg. Nelle nostre colture IFN α induce la produzione di IL-6, ma questo effetto viene inibito in presenza delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. Questa evidenza insieme all'utilizzo dell'anticorpo monoclonale bloccante IL-6, esclude IL-6 come citochina coinvolta nel blocco della soppressione mediato da IFN α .

I nostri risultati inoltre dimostrano che IFN α agisce direttamente sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e sulle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg. A tale riguardo, l'espressione di IFNAR entrambe le popolazioni, potrebbe giocare un ruolo chiave sull'attivazione cellulare da parte di IFN α . I nostri risultati dimostrano che IFNAR viene modulata differently durante l'attivazione cellulare. In linea con questi risultati, le cellule CD4⁺ T *naive* e attivate rispondono in modo differente all'azione di IFN α , in termini di espressione del CD25 e Ly6C. Capire il meccanismo alla base della modulazione di IFNAR sulle cellule CD4⁺CD25⁻ Th e CD4⁺CD25⁺ Treg, potrebbe avere importanti implicazioni per lo sviluppo di nuovi approcci immuno-terapeutici.

Bibliografia

- 1) Paul W. E. 1998. *Fundamental Immunology*.
- 2) Goldby R. A., Kindt T. J, B. A. Osborne, Kuby. 2001. *Immunologia*.
- 3) Fontenot J. D. Rudensky A.Y. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory t cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*. 6(4):331-7.
- 4) Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, Bacchetta R, Levings MK. 2008. CD4⁺ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev*. Jun;223:391-421. Review.
- 5) Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. 2007. Regulatory T cells-a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 37 Suppl 1:S116-23.
- 6) N. Ohkura, S.Sakaguchi. 2010. Regulatory t cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol*. Review.
- 7) Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* ;213:257.
- 8) Read S. Powrie F. 2001. CD4⁺ regulatory T cells. *Current opinion in immunology*. 13(6):644-9. C. C.
- 9) Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, C. G. Vinuesa. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 435: 590-597.
- 10) Lal G, Bromberg JS. 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*.114(18):3727-35
- 11) Schwartz R. H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology*. 6(4):327-30.
- 12) Ladi E. Yin X. Chtanova T. Robey E. A. 2006. Thimic microenviroments for t cell differentiation and selection. *Nature immunology*. 7(4):338-43.
- 13) Fontenot J. D. Rasmussen J. P. Williams L.M. Dooley J. L. Farr A. G. and Rudensky A.Y. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 22(3): 329-41.

- 14) Boehmer V. H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology*. 6(4):338-44-.
- 15) Nakamura K, Kitani A. Strober W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.*;194(5):629-44.
- 16) Gondek D. C. Li-Fan L. Quezada S.A. Sakaguchi S. Noelle R. J. 2005. Cutting Edge: Contact-Mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme b-dependent, perforin independent mechanism. *Journal of immunology*,174(4):1783-6.
- 17) Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review Of Immunology*. 22: 531-62
- 18) L. Pace, S. Rizzo, C. Palombi, F. Brombacher, G. Doria. 2006. Cutting Edge: IL-4-Induced Protection of CD4⁺CD25⁻ Th Cells from CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *The Journal of Immunology*. 176: 0000-0000.
- 19) Erb KJ. Ruger B. Von Brevern M. Ruffel K. B. Schimpl A. Rivett K. 1997. Constitutive expression of IL-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice. *The Journal of Experimental Medicine*.
- 20) Pace L. Pioli C. Doria G. 2005. 2006. Cutting Edge: IL-4-Induced Protection of CD4⁺CD25⁻ Th Cells from CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *The Journal of Immunology*. 174(12):7645-53.
- 21) Wing K. Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.2010. *Nature Immunology*;11(1):7-13.
- 22) Singh, B. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 182, 190–200.
- 23) Danke, N. A, Yang, J, Greenbaum, C. & Kwok, W.W. Comparative study of GAD65- specific CD4⁺ T cells in healthy and type 1 diabetic subjects. *J. Autoimmun.*2005. 25; 303–311.
- 24) Itoh, M.1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key

- function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162, 5317–5326.
- 25) Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. 2010. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med*;16(2):58-68.
 - 26) Theofilopoulos A. N. Baccala R. Beutler B. Kono D. H. 2005. Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annual Review of Immunology.* 23: 307-336.
 - 27) Le Bon A. Tough D.F. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. opin. immunol.* 14:432-436.
 - 28) Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. 2005.*Immunol Rev.*204:9-26.
 - 29) L. C. Platanius. 2005. Mechanisms of type I and type II interferon mediated signalling. *Nature Immunology.* 5: 375-386.
 - 30) Colonna M, Krug A, Cella M. 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol.*14(3):373-9.
 - 31) C. A. Boiron. 2001. Interferon α and β as Immune Regulators - A New Look. *Immunity.* 14: 661-664.
 - 32) 19) K. Honda, H Yanai, A. Takaoka, T. Taniguchi. 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International Immunology.* 17. n° 11: 1367-1378.
 - 33) Gallucci S. Lolkema M. matzinger P. 1999- Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5:1249-1255
 - 34) Chawla-Sarkar M. Lindner D. J. Liu Y. F. Williams B.R. Sen G.C.Silverman R.H. Borden E. C.2003. apoptosis and interferons: role of interferon stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8:237-249.
 - 35) Ronnblom L, Alm GV. 2001. An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol*;22:427–431.
 - 36) Gota C, Calabrese L. Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon-alpha. 2003;*Autoimmunity.* 36:511–518.

- 37) Myara M, and Sakaguchi S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanism of suppression. *Trends. Mol. Med.* 13:108-116.
- 38) Schiavoni G, mattei F, Di Pucchio T, Santini S.M, Bracci L, Berardelli F, Proietti E. 2000. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44 (hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood.* 95:2024-30.
- 39) Tokoyoda K, Zehentmeier S, Hegazy A.N, Albrecht J. R, Grun M, Lohning, Radbruch A. 2009. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity.* 5:721-30.
- 40) Takahasashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, sakaguchi S. 1998. Immunologic self-tolerance of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969-1980.
- 41) Thornton A. M, Shevach E. M. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. exp. Med.* 188:287-296.
- 42) Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, Tough D. F. 2001. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood.* 99(9):3263-3271.
- 43) Proietti E, Bracci L, Puzelli S, Di Picchio T, Sestili P, De Vincenzi E, Venditti M, Capone I, Seif I, De Maeyer E, Tough D, donatelli I, Berardelli F. 2002. Type I IFN as natural adjuvant for protective immune response: lesson from influenza vaccine model. *J. Immunol.* 196:375-383.
- 44) Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U, Tough D.F. 2006. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J. immunol.* 176:2074-2078.

- 45) Erickson S, Sangfelt J, Castro M, Heyman S, Eihorn D, Grander D. 1999. Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins. *Cell Growth Differ.* 10:575-582.
- 46) Petricoin E. F. 3rd, Ito S, Williams B. L, Audet S, Stancato L. F, Gamero A, Clouse K, Grimley P, Weiss A, Beeler J, Finbloom D. S, Shores E. W, Abraham R, Larner A. C. 1997. Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signaling. *Nature.* 390:629-632.
- 47) Tang Q, Adams Y, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo C. A, Salomon B. L, Bluestone J. A. 2008. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity.* 28:687-697.
- 48) Malek T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26:453-479.
- 49) Jones S. A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175:3463-8.

Abstract

Type I IFNs are central to a vast array of immunological functions. Their early induction in innate immune responses provides one of the most important priming mechanisms for the subsequent establishment of acquired immune responses. The outcome is either promotion or inhibition of these responses, but the conditions under which one or the other prevails remain to be defined. The main objective of the present study has been to determine the involvement of IFN α on murine CD4⁺ CD25⁻ Th cell activation, as well as to define the role played by this cytokine on CD4⁺ CD25⁺ Treg cell proliferation and function. Although IFN α induces CD4⁺ CD25⁻ Th cells co-incubated with APCs to produce large amounts of IL-2, at the same time their ability to respond to its proliferative effects is prevented. Moreover, in medium supplemented with IFN α , IL-2 induced CD4⁺ CD25⁺ Treg cell proliferation is also inhibited. Notably, IFN α also leads to a decrease of the CD4⁺ CD25⁺ Treg cell suppressive activity. Altogether, these findings indicate that through a direct effect on APC activation and by affecting CD4⁺ CD25⁺ Treg cell-mediated suppression, IFN α promotes and drives CD4⁺ CD25⁻ Th cell activation.