

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE:  
PROGETTO N. 2 “EMATOLOGIA CLINICA E  
SPERIMENTALE ED EMATOPATOLOGIA”**

**Ciclo XXIII**

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/15**

**NUOVI MECCANISMI DI REGOLAZIONE  
DELL’AUTOIMMUNITA’ NELLA  
PIASTRINOPENIA IMMUNE**

**Presentata da: Dott.ssa Daria Sollazzo**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Stefano Pileri**

**Relatore**

**Dott.ssa Lucia Catani**

**Esame finale anno 2011**

# INDICE

<b>SOMMARIO</b>	pag. 1
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 3
<b>I. La Piastrinopenia Immune</b>	pag. 3
a) Aumentata distruzione delle piastrine circolanti	pag. 4
b) Ridotta produzione delle piastrine a livello midollare	pag. 8
<b>II. Tolleranza immunologica ed autoimmunità</b>	pag. 9
<b>III. I linfociti T regolatori (Tregs)</b>	pag. 11
Tregs e linfociti B	pag. 16
Tregs e monociti/macrofagi	pag. 17
Tregs nelle malattie autoimmuni	pag. 18
Tregs nella PTI	pag. 21
<b>IV. Le cellule dendritiche (DCs)</b>	pag. 22
DCs e induzione della tolleranza: il ruolo di IDO	pag. 24
Soppressione della risposta T cellulare mediata da IDO	pag. 28
DCs nella PTI	pag. 29
<b>V. “Cross-talk” tra Tregs e DCs</b>	pag. 30
<b>VI. I linfociti Th17</b>	pag. 34
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 36
<b>MATERIALE E METODI</b>	pag. 37
Pazienti e controlli	pag. 37

Isolamento delle cellule mononucleate	pag. 37
Caratterizzazione e quantificazione dei Tregs	pag. 37
Generazione di DCs derivate da monociti (mo-DCs)	pag. 39
Purificazione di cellule T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	pag. 39
Generazione in vitro di cellule T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	pag. 40
Valutazione dell'espressione di IDO nelle mo-DCs	pag. 41
Valutazione dell'attività enzimatica di IDO	pag. 41
Valutazione dell'attività soppressoria dei Tregs	pag. 42
Valutazione della capacità dei Tregs di inibire la maturazione delle mo-DCs	pag. 43
Caratterizzazione e quantificazione di linfociti Th17	pag. 43
Analisi statistica	pag. 44
<b>RISULTATI</b>	pag. 45
Frequenza ridotta dei Tregs circolanti nei pazienti con PTI	pag. 45
Generazione in vitro di cellule T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	pag. 46
Valutazione dell'espressione e dell'attività di IDO nelle mo-DCs mature	pag. 46
Valutazione dell'attività soppressoria dei Tregs	pag. 47
Capacità dei Tregs di inibire la maturazione delle mo-DCs	pag. 48
Quantificazione dei linfociti Th17	pag. 50
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	pag. 51
<b>FIGURE</b>	pag. 55
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 62

## SOMMARIO

La Piastinopenia Immune (PTI) è una patologia autoimmune ad eziologia ignota caratterizzata da piastrinopenia. I linfociti T regolatori (Tregs) sono coinvolti nei meccanismi di tolleranza immunologica e agiscono regolando l'attività delle cellule T autoreattive e delle cellule dendritiche (DCs). Viceversa, le DCs, che esprimono Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), partecipano al mantenimento della tolleranza agli auto-antigeni attraverso l'espansione dei Tregs. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che i linfociti T helper 17 (Th17) sono coinvolti nell'autoimmunità e che l'espressione di Interleuchina (IL)-17 è associata a numerose patologie autoimmuni. Il ruolo dell'interazione fra DCs e Tregs ed il ruolo dei Th17 nella patogenesi della PTI non sono mai stati studiati in maniera approfondita. Gli obiettivi principali di questa tesi sono stati: a) caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente i linfociti Tregs e DCs; b) valutare il ruolo patogenetico dell'interazione tra Tregs e DCs; c) quantificare i Th17 circolanti.

I risultati dimostrano che: 1) il numero dei Tregs circolanti dei pazienti, identificati tramite i marcatori Foxp3 e CD127, è significativamente ridotto rispetto alla controparte normale; 2) la conversione in vitro delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in linfociti Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) dopo stimolazione con DCs mature è significativamente ridotta nei pazienti rispetto ai controlli; 3) sia l'espressione dell'enzima IDO nelle DCs mature (mRNA) che i livelli di chinurenine prodotte (indice di attività enzimatica) sono risultati significativamente ridotti nei pazienti rispetto alla controparte normale. Questi risultati suggeriscono quindi che il ridotto numero dei Tregs circolanti nei pazienti con PTI può essere, almeno in parte, attribuito alla scarsa capacità di conversione delle DCs, in quanto tali cellule esprimono meno IDO.

I risultati dimostrano inoltre che: 1) i Tregs dei pazienti con PTI hanno una capacità soppressoria che è significativamente inferiore rispetto ai soggetti normali; tale dato è stato confermato dal dosaggio di IFN- $\gamma$  nel surnatante della coltura; 2) i Tregs di pazienti con PTI non sono in grado di inibire la maturazione delle DCs, a differenza di quanto avviene nei soggetti sani: infatti, l'espressione delle molecole costimolatorie CD80 e CD86 sulle DCs è risultata invariata in seguito a cocoltura con DCs immature; 3) il dosaggio delle citochine nel surnatante delle coculture dimostra che la concentrazione di IL-10 e IL-6 è significativamente ridotta nei pazienti rispetto ai controlli. La scarsa abilità dei Tregs di inibire la maturazione delle DCs e l'alterato *pattern* di secrezione di citochine potrebbero quindi contribuire all'insorgenza del fenotipo più maturo delle DCs nei pazienti con PTI.

I linfociti Th17 circolanti di pazienti e controlli sono stati identificati in citofluorimetria come cellule CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup>. Da tale analisi è emerso che la frequenza dei Th17 circolanti non è significativamente diversa nei due gruppi.

Questi dati dimostrano quindi che nella PTI l'interazione bidirezionale tra Tregs e DCs risulta alterata e svolge un ruolo patogenetico, in quanto, da un lato, ci sono Tregs con un deficit numerico e funzionale e, dall'altro, DCs con maggiore capacità immunogenica. Il numero dei Th17 non risulta invece alterato.

# INTRODUZIONE

## **I. La Piastrinopenia Immune**

La Piastrinopenia Immune (PTI), nota anche come Morbo di Werlhof, è una malattia acquisita caratterizzata da piastrinopenia (piastrine  $<150.000/\text{mm}^3$ ) per (a) aumentata distruzione periferica delle piastrine e/o (b) ridotta produzione a livello midollare. La patogenesi è immunitaria, ma la causa della perdita di tolleranza verso il *self* non è nota (Semple, 1998; Karpatkin, 1997).

Le piastrinopenie possono essere classificate in 5 gruppi in base alle cause che le determinano:

- I gruppo: dovute ad una carente produzione di piastrine per riduzione del numero di megacariociti
- II gruppo: caratterizzate da piastrinopoiesi inefficace
- III gruppo: causate da aumentata distruzione delle piastrine circolanti per cause extra o intracorporeali
- IV gruppo: dovute ad un aumento del consumo di piastrine
- V gruppo: causate dal sequestro delle piastrine in un territorio vascolare patologicamente dilatato (splenomegalia, emangiomi).

La PTI appartiene alle piastrinopenie del III gruppo; è una patologia relativamente comune nell'infanzia con 5,8 casi in Europa ogni 100.000 bambini. Negli adulti l'incidenza annuale è di 1,6-3,2 casi su 100.000; l'età media alla diagnosi è di 56 anni, con una lieve preponderanza nei soggetti femminili (Psaila, 2007). La maggior parte dei pazienti mostra sintomi di sanguinamento solo minori, come epistassi, petecchie ed ecchimosi che compaiono in genere quando la conta piastrinica arriva a valori inferiori a  $50.000/\mu\text{l}$  (Cines, 2005). Eventi severi di sanguinamento, come emorragia

intracranica, ematuria o sanguinamento gastrointestinale, sono più rari, ma la loro prevenzione rimane il principale scopo del trattamento (Tura, 1998). La severità della piastrinopenia correla in parte, anche se non completamente, con il rischio di sanguinamento. Esistono fattori addizionali (quali ad esempio l'età, lo stile di vita, l'uremia) che possono aumentare questo rischio e che vanno valutati prima di scegliere l'appropriata terapia (Provan, 2010).

La PTI viene classificata sulla base della durata della malattia in nuova diagnosi, persistente (3-12 mesi) e cronica (superiore o uguale a 12 mesi) (Rodeghiero, 2009). Negli adulti la PTI esordisce generalmente in modo insidioso e normalmente ha un decorso cronico. Nei bambini, invece, ha un esordio improvviso ed un rapido decorso; spesso è preceduta da alcune settimane da una infezione virale. La guarigione si verifica spontaneamente in circa il 70% dei casi entro 6 mesi (Provan, 2010).

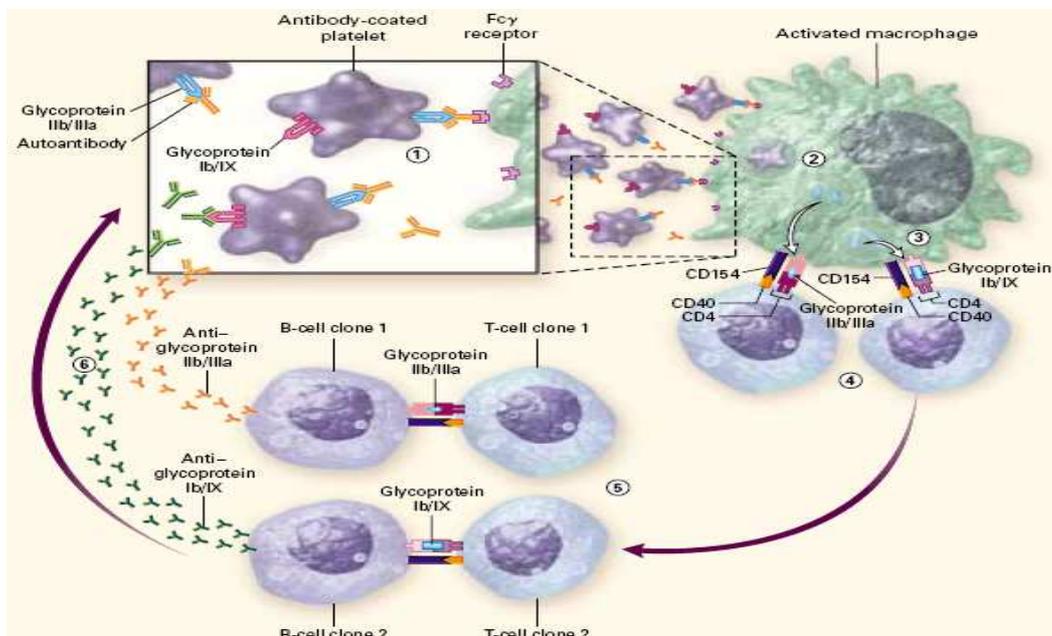
La terapia della PTI in prima linea (trattamento iniziale per le nuove diagnosi) è basata sull'impiego di cortisonici o IgG; generalmente si privilegia l'utilizzo di cortisone per stabilizzare la malattia. Nel caso non avvenga remissione, in seconda linea il paziente è candidato alla splenectomia, che ha elevate probabilità di successo se il sequestro piastrinico è splenico o splenoepatico, oppure a trattamento con farmaci immunosoppressori (Provan, 2010).

#### *a) Aumentata distruzione delle piastrine circolanti*

Nel 70% circa dei pazienti con malattia attiva sono evidenziabili autoanticorpi diretti contro le piastrine. Si tratta di Immunoglobuline (Ig), in genere IgG (anche se in alcuni pazienti sono stati osservati anticorpi IgM e IgA) che aderiscono specificamente alla membrana piastrinica riconoscendo le glicoproteine esposte (GPIb, GPIIb e GPIIIa) e fissano il complemento (McMillan, 1987; Cines, 2002) (figura A). I macrofagi, dopo aver riconosciuto il frammento Fc delle Ig ed il complemento, catturano, fagocitano e distruggono le piastrine circolanti. A causa di ciò, la sopravvivenza piastrinica (valori

normali 8-10 giorni) può essere ridotta a pochi giorni o ore. L'aumentata distruzione piastrinica, infatti, è uno dei principali meccanismi patogenetici descritti per la PTI. Poichè il sistema macrofagico è particolarmente attivo nella milza, quest'organo costituisce la principale sede di distruzione delle piastrine, la cui entità è correlata alla quantità ed all'attività degli anticorpi adesi alle piastrine stesse.

Per ciò che concerne la patogenesi, lo stimolo iniziale che porta alla produzione degli autoanticorpi anti-piastrine è tuttora sconosciuto, ma è indubbiamente regolato da complessi meccanismi cellulari e solubili che coinvolgono principalmente linfociti T-helper e APCs (Antigen Presenting Cells) (Figura A). Attualmente, non è ancora chiaro se il sistema immunitario si attivi in maniera autonoma o se modificazioni strutturali e/o conformazionali delle glicoproteine piastriniche avvengano in seguito a fattori non ancora noti, inducendo l'attivazione del sistema immunitario (Semple, 1998; Semple, 2002).



**Figura A. Patogenesi della PTI.**

Da Cines DB, Blanchette VS. Immune Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 2002; 346:995-1008.

E' stato, comunque, ipotizzato che le piastrine siano la sorgente primaria di autoantigeni e che le cellule dendritiche (DCs) ed i macrofagi, normalmente

responsabili della distruzione delle piastrine senescenti, siano le APCs iniziali che stimolano le cellule T helper (Semple, 1998; Semple, 2002). In particolare, l'apoptosi piastrinica potrebbe essere uno dei meccanismi tramite i quali antigeni "criptici" sono esposti, ma non riconosciuti come *self*. Se le cellule apoptotiche non sono correttamente eliminate, infatti, possono esporre antigeni in grado di attivare una risposta specifica da parte di cellule T-citotossiche (Savill, 2002; Albert, 1998). L'apoptosi può anche facilitare il riconoscimento di antigeni intracellulari tramite la formazione di *blebs* sulla membrana cellulare o addirittura generare neoantigeni (Casciola-Rosen, 1994). A tale proposito è stato recentemente dimostrato che, nei pazienti con PTI, le piastrine (sia fresche, che invecchiate *in vitro*) mostrano una maggiore apoptosi rispetto a quelle di soggetti sani (Catani, 2006). Tuttavia, se l'apoptosi piastrinica abbia effettivamente un ruolo nella produzione di anticorpi anti-piastrine o sia invece la conseguenza di attività anticorpale, resta tuttora oggetto di indagine.

Ulteriori evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato che il fenotipo piastrinico è alterato in pazienti con PTI. In questi soggetti, infatti, risulta incrementata l'espressione di HLA-DR (recettore di superficie appartenente agli MHC-II), CD40L (o CD154, molecola costimolatoria) e CD80 (altra molecola costimolatoria) sulle piastrine, suggerendo quindi un possibile ruolo diretto delle piastrine nell'attivazione del meccanismo autoimmune (Boshkov, 1992; Solanilla, 2005; Semple, 1991).

In seguito al legame con l'anticorpo, le piastrine vengono rimosse dal circolo tramite fagocitosi o lisi piastrinica mediata dal complemento (Cines, 2002; McMillan, 2007). In particolare, il complesso piastrina-anticorpo interagisce con i macrofagi a livello della milza. Tali macrofagi, poi, sarebbero in grado di processare gli antigeni piastrinici e presentarli sulla loro superficie attraverso le molecole MHC di classe II. Se i recettori dei linfociti T helper hanno sufficiente affinità per il complesso peptide piastrinico-MHC-II, in

concomitanza con eventi costimolatori (CD40 sulle APCs/CD154 sui linfociti T-helper o CD80-86 sulle APCs/CD28 sui linfociti T-helper), le cellule T helper si attivano e inducono i linfociti B autoreattivi a differenziarsi in plasmacellule ed a produrre anticorpi.

Numerosi dati indicano una stretta associazione tra i macrofagi attivati, i prodotti da essi secreti e la malattia. Ad esempio, livelli significativi di M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), una citochina che stimola il differenziamento di linee cellulari monocitiche ed è un potente attivatore macrofagico, sono stati trovati in pazienti con PTI cronica. Tale citochina, ad elevate concentrazioni, può alterare le funzioni dei macrofagi, attivandoli (Zeigler, 1993; Moire, 1980; Hame, 1988). Inoltre, nel siero dei pazienti con PTI sono stati rilevati livelli elevati di GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor). Si ritiene che questa citochina venga rilasciata in grande quantità dai linfociti T helper attivati che stimolano, in tal modo, la fagocitosi macrofagica e, quindi, la distruzione delle piastrine (Semple, 1998; Semple, 2002).

Varie anomalie dei linfociti T sono state descritte nei pazienti con PTI. Alcuni Autori hanno evidenziato una diminuzione dei linfociti T-soppressori CD8<sup>+</sup> ed alterazioni nel rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, altri hanno rilevato un normale rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, ma un numero aumentato di linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Semple, 1991; Trent, 1981; Lauria, 1981). E' stato, poi, documentato un aumento nel numero dei linfociti T CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> nei pazienti con PTI cronica (Mizutani, 1987; Garcia-Suarez, 1993). Tale dato può essere rilevante, poiché i linfociti T HLA-DR<sup>+</sup> attivati possono attivare le restanti cellule T CD4<sup>+</sup> e modulare il riconoscimento autoreattivo *in vivo* (Bouchonnet, 1994). Altre evidenze sperimentali hanno dimostrato una notevole espansione oligoclonale di cellule T nel sangue periferico di questi pazienti (Shimomura, 1996).

Tuttavia, il dato più importante per ciò che concerne la caratterizzazione dei linfociti T, riguarda la presenza di linfociti T autoreattivi nei pazienti con PTI.

Questi linfociti sono precedentemente sfuggiti al meccanismo di “delezione clonale” nel timo e non riconoscono le glicoproteine delle piastrine come *self*. Ciò porta, quindi, alla produzione di autoanticorpi specifici da parte delle cellule B e in particolare da parte delle plasmacellule. Linfociti T autoreattivi sono stati documentati anche in soggetti normali; tuttavia, i dati sperimentali dimostrano che solo nei pazienti con PTI sono attivati. In particolare, è stato dimostrato che, in corso di PTI, i linfociti T autoreattivi sono in grado di reagire contro antigeni piastrinici modificati (digestione di glicoproteine IIb-IIIa) e non contro le proteine native (Semple, 1998; Nomura, 1995; Crossley, 1996; Andersson, 2000). Questo dato suggerisce, quindi, che avvengano modificazioni delle glicoproteine piastriniche e che queste siano responsabili del mancato riconoscimento di antigeni *self* da parte del sistema immune.

In conclusione, possiamo affermare che la PTI è una patologia complessa che coinvolge piastrine, cellule presentanti l'antigene, cellule T e cellule B/anticorpi.

*b) Ridotta produzione delle piastrine a livello midollare*

Il fallimento nella risposta alla terapia immunosoppressiva o alla splenectomia, in circa un terzo dei casi, e la mancata determinazione degli anticorpi anti-piastrine in circa il 30% dei pazienti fa ipotizzare che altri meccanismi, oltre alla distruzione periferica delle piastrine, contribuiscano all'insorgenza della malattia. Allo stato attuale è opinione comune, infatti, che la piastrinopenia della PTI sia da attribuire anche ad una ridotta produzione piastrinica midollare.

Tale ipotesi si basa sulle seguenti evidenze sperimentali in corso di PTI:

- 1) in una parte dei pazienti (circa il 30%) è stato osservato un ridotto *turnover* piastrinico;
- 2) il numero di megacariociti nel midollo osseo risulta normale o lievemente aumentato (Heyns, 1982; Ballem, 1987);

3) i megacariociti presentano caratteristiche morfologiche di apoptosi. Infatti, un'analisi ultrastrutturale tramite microscopia elettronica mostra come l'80% di megacariociti maturi, in soggetti con PTI, risulta in apoptosi (con cromatina marginata, nucleo frammentato e presenza di corpi apoptotici) o para-apoptosi (con vacuolizzazione del citoplasma, cromatina condensata e mitocondri rigonfi) (Houwerzijl, 2004; Houwerzijl, 2006);

4) il plasma dei pazienti con anticorpi anti-piastrine è in grado di inibire la proliferazione e la maturazione (ploidia) di cellule megacariocitarie normali ottenute *in vitro* a partire da cellule staminali CD34<sup>+</sup> (Chang, 2003).

Sulla base di tali evidenze sperimentali si è ipotizzato, quindi, che gli autoanticorpi diretti contro le glicoproteine delle piastrine siano in grado di riconoscere anche i medesimi antigeni sulla superficie dei megacariociti. La ridotta produzione piastrinica potrebbe, perciò, essere dovuta alla presenza di anticorpi con effetto diretto sulla maturazione di megacariociti e/o sul rilascio delle piastrine (McMillan, 2007; Gernsheimer, 2009; Cines, 2007).

Si può, quindi, affermare che la PTI è una malattia ad eziopatogenesi eterogenea ove sono stati dimostrati meccanismi di aumentata distruzione e/o ridotta produzione piastrinica.

## **II. Tolleranza immunologica ed autoimmunità**

Il sistema immunitario ha la funzione di proteggere l'organismo dall'attacco di agenti patogeni (antigeni) mediante la sintesi di molecole altamente specializzate (anticorpi) e la generazione di elementi cellulari (linfociti e fagociti) che contrastano e distruggono gli antigeni. La tolleranza immunologica si definisce come uno stato di non responsività ad un antigene, indotto da una precedente esposizione a quello stesso antigene. La caratteristica fondamentale del sistema immunitario normale è rappresentata

dalla tolleranza agli antigeni *self*. La mancanza di questa condizione, infatti, si traduce nello sviluppo di risposte immunitarie verso antigeni autologhi e, di conseguenza, nell'instaurarsi di malattie autoimmuni. La tolleranza al *self* può essere indotta negli organi linfoidei primari in seguito al riconoscimento degli antigeni *self* da parte dei linfociti autoreattivi immaturi (tolleranza centrale) o negli organi linfoidei periferici in seguito all'incontro di linfociti maturi autoreattivi con antigeni *self* in particolari condizioni (tolleranza periferica).

La tolleranza centrale si verifica perché tutti i linfociti, nel corso della loro maturazione negli organi linfoidei primari, passano attraverso uno stadio in cui l'incontro con l'antigene porta alla tolleranza piuttosto che all'attivazione. La tolleranza periferica si genera grazie al riconoscimento degli antigeni in assenza di un livello adeguato di costimolazione o grazie ad una persistente e ripetuta stimolazione per opera degli antigeni autologhi a livello dei tessuti periferici.

I meccanismi principali alla base della tolleranza linfocitaria sono: 1) la morte cellulare per apoptosi, detta "delezione clonale"; 2) l'inattivazione funzionale della cellula, chiamata "anergia clonale"; 3) la soppressione dell'attivazione linfocitaria e delle funzioni effettrici ad opera di linfociti ad azione regolatrice (Abbas, 2000). La delezione clonale può essere causata dalla ripetuta stimolazione dei linfociti attivati da parte di antigeni persistenti. L'attivazione dei linfociti, infatti, porta alla co-espressione di due molecole: un recettore capace di tradurre un segnale di morte cellulare, chiamato Fas, e il suo ligando, FasL. L'anergia clonale, invece, è un fenomeno che si può verificare quando un peptide antigenico è presentato in assenza di molecole costimolatorie o quando linfociti T specifici per un determinato antigene vengono in contatto con una forma mutata dell'antigene. Alcune risposte immunitarie vengono inibite da linfociti T soppressori, che producono citochine in grado di bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettrici. Questi linfociti si caratterizzano per la capacità di rilasciare citochine anti-

infiammatorie, quali Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ , Interleuchina (IL)-10, IL-4 e IL-13 (Jang e Chess, 2004; O'Garra e Vieira, 2004). Quest'ultimo meccanismo è stato scoperto solo di recente, quando nel 1995 Sakaguchi ha dimostrato per la prima volta che l'attività regolatoria è propria soltanto di una particolare popolazione di cellule T con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Tali linfociti sono stati denominati linfociti T regolatori (Tregs).

Risulta chiaro, quindi, che sia la carenza che l'alterazione dei meccanismi normalmente responsabili del mantenimento della tolleranza possono determinare una risposta del sistema immunitario nei confronti del *self* e quindi provocare l'insorgenza di fenomeni di autoimmunizzazione. La perdita della tolleranza nei confronti degli autoantigeni può essere la conseguenza sia di una selezione anomala dei linfociti autoreattivi, cioè di un difetto della tolleranza centrale, sia di alterazioni della presentazione degli autoantigeni alle cellule del sistema immunitario, cioè di un'anomalia della tolleranza periferica.

### **III. I linfociti T regolatori**

I linfociti T soppressori furono originariamente identificati come una sottopopolazione di cellule T, diversa dai linfociti T helper e citotossici, la cui funzione era quella di inibire la risposta immunitaria (Gershon, 1972). Studi condotti negli anni '70 hanno dimostrato che, se si iniettavano linfociti T di topi resi tolleranti ad un dato antigene in animali non precedentemente esposti a quell'antigene, gli animali riceventi diventavano non responsivi all'antigene. Attualmente si ritiene che non esista una popolazione di linfociti T ben definita che svolga unicamente la funzione di sopprimere la risposta immunitaria; è invece probabile che molti linfociti T possano, di volta in volta,

comportarsi da soppressori di risposte immunitarie a seconda delle circostanze.

I Tregs svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della tolleranza immunitaria, sia verso antigeni autologhi che verso antigeni allogenici. Alcuni Tregs esercitano la propria azione soppressiva mediante contatto diretto cellula-cellula, altri producono citochine con funzioni immunoregolatorie, come IL-10 e TGF- $\beta$  (Fehervari, 2004).

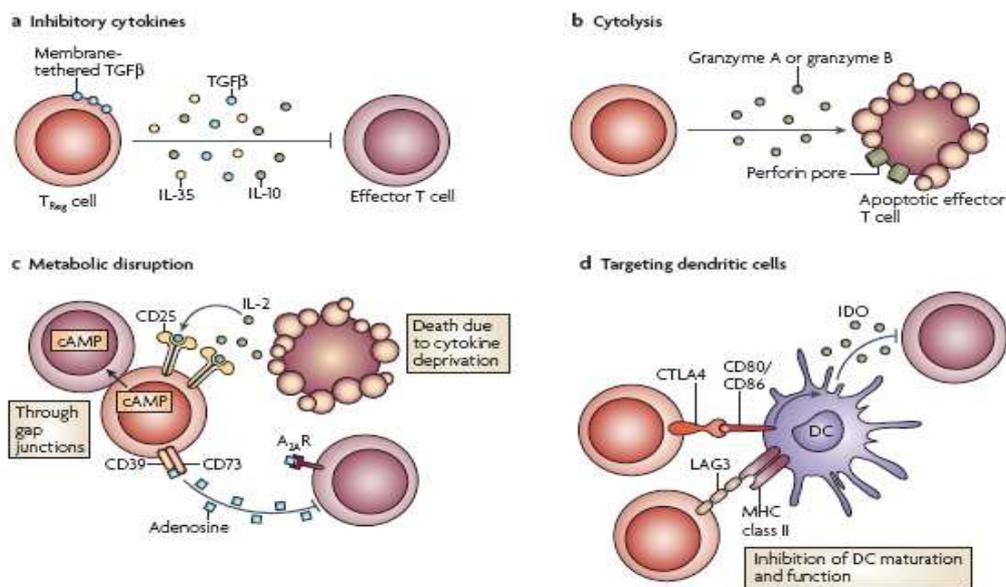
Inizialmente è stata identificata nel topo una popolazione di cellule regolatorie CD4<sup>+</sup> che esprimono costitutivamente la catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2 (CD25) e che mostrano una forte attività soppressiva sia *in vitro* che *in vivo* (Sakaguchi, 2000). Questi Tregs murini sono anergici se stimolati *in vitro* con un anticorpo diretto contro il CD3, proliferano se stimolati con IL-2 esogena e sopprimono l'attivazione e la proliferazione di altri linfociti T tramite un meccanismo che richiede il contatto cellulare. Inoltre, esprimono in maniera costitutiva anche il CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4), un regolatore negativo dell'attivazione T cellulare indispensabile per la soppressione della risposta *in vivo* (Read, 2000). Alla luce delle potenti capacità soppressive dei Tregs murini, si è cercato di verificare la presenza di una simile popolazione cellulare anche nell'uomo. I risultati ottenuti dimostrano che i Tregs sono presenti nel sangue periferico umano; rappresentano circa il 3% delle cellule totali presenti nel sangue e circa il 13% dei linfociti CD4<sup>+</sup>. La maggior parte di essi esprime, oltre alle molecole CD4 e CD25, anche i marker CD45RO, HLA-DR, CTLA-4 ed il fattore citoplasmatico Foxp3 (Forkhead box p3); l'espressione di quest'ultimo sui Tregs è accompagnata da una down-regolazione del marker di superficie CD127 (recettore per IL-7) (Banham, 2006). I Tregs mostrano, inoltre, una ridotta espressione del CD40L, una up-regolazione del CTLA-4 in seguito a stimolazione mediata dal T cell receptor e producono citochine soltanto se attivati da APC allogeniche: le citochine prodotte sono rappresentate principalmente da IL-10, TGF- $\beta$  e da bassi livelli

di Interferon (IFN)- $\gamma$ . Essi, inoltre, non mostrano proliferazione in risposta ad allo-antigeni.

Il fattore di trascrizione Foxp3 ha un ruolo importante sia nello sviluppo che nella funzionalità dei Tregs. Infatti, la presenza di mutazioni nel gene umano *Foxp3* è causa di una malattia genetica chiamata IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome), caratterizzata da iperattivazione di cellule CD4<sup>+</sup> e sovrapproduzione di citochine pro-infiammatorie (Ochs, 2005). Inoltre, la trasduzione di Foxp3 in cellule T *naive* aumenta l'espressione di CD25 e di altre molecole di superficie, come CTLA-4 e GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor, una molecola di superficie coinvolta nell'inibizione del ruolo soppressorio dei Tregs); allo stesso tempo reprime la produzione di IFN- $\gamma$  (una citochina caratteristica sia dell'immunità innata che di quella acquisita), di IL-4 (citochina che induce il differenziamento di linfociti T-helper *naive*) e di IL-2 (Fontenot, 2003). In particolare, proprio tramite IL-2 è attivo un controllo a feedback della risposta immunitaria. L'IL-2, prodotta da cellule T attivate (non regolatorie), contribuisce al mantenimento, all'espansione ed all'attivazione di Tregs che, a loro volta, limitano l'espansione di cellule T prive di ruolo regolatorio (Sakaguchi, 2008).

I meccanismi mediante i quali i Tregs sopprimono l'attività di cellule effettrici possono essere classificati secondo quattro modalità di azione (Figura B):

- soppressione tramite citochine inibitorie;
- citolisi;
- "interruzione metabolica";
- modulazione di maturazione/funzionalità di DCs



**Figura B. Meccanismi di soppressione dei Tregs.**

Da Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(7):523-32.

Per quanto riguarda il primo meccanismo, le citochine maggiormente coinvolte sembrano essere IL-10 (citochina con ruolo anti-infiammatorio, in grado di sopprimere il rilascio di citochine pro-infiammatorie e inibire la capacità di presentare gli antigeni nelle APCs) e TGF- $\beta$  (una proteina che controlla l'espressione di Foxp3 ed il differenziamento di Tregs), soprattutto in fenomeni allergici o infettivi, ma anche in situazioni di carcinogenesi (Vignali, 2008). Recentemente l'IL-35 (citochina coinvolta nella soppressione della risposta infiammatoria) è stata descritta come espressa preferenzialmente dai Tregs e da essi richiesta per raggiungere un livello massimo di attività soppressoria (Collison, 2007).

I Tregs possono inoltre limitare l'espansione di cellule T effettrici o APCs anche tramite l'impiego di granzimi o perforine. In particolare, il granzima A appartiene alla famiglia delle serin-proteasi principalmente presenti nei granuli citoplasmatici di linfociti e cellule NK. Esso penetra nelle cellule bersaglio utilizzando pori creati dalle perforine, poi taglia ed attiva le caspasi intracellulari allo scopo di indurre apoptosi nella cellula target stessa (Vignali, 2008). Uno studio recente suggerisce che i Tregs possono provocare citolisi anche mediante la via TRAIL-DR5 (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis

Inducing Ligand-Death Receptor 5) (Ren, 2007). Inoltre, nei Tregs è stata dimostrata l'up-regolazione di Galectina-1, una proteina normalmente coinvolta nell'induzione di apoptosi di cellule T (Garín, 2007).

Un altro meccanismo di soppressione si basa sull'invio di segnali di "interruzione metabolica" alle cellule T *responder*; uno di questi segnali è l'up-regolazione dell'AMP ciclico intracellulare il quale, trasferito nelle cellule bersaglio tramite *gap junctions*, inibisce la loro proliferazione e la produzione di IL-2 (Bopp, 2007); l'altro segnale negativo è la generazione di adenosina pericellulare catalizzata da CD39 (ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi 1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidasi) espressi dai Tregs (Tang, 2008). Il legame dell'adenosina pericellulare con un particolare recettore determina l'inibizione della funzionalità di cellule T effettrici e stimola la produzione di Tregs tramite l'inibizione dell'espressione di IL-6 (citochina che ha ruolo nella produzione di cellule pro-infiammatorie, quali linfociti Th17) e stimolo del rilascio di TGF- $\beta$  (Zarek, 2008; Oukka, 2007).

I Tregs attivati possono, inoltre, stimolare le DCs a produrre Indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO). IDO è un enzima con funzione immunosoppressiva che catalizza la conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in chinurenine (metaboliti tossici per le cellule T). Questa proprietà conferisce a IDO la capacità di inibire la risposta immunitaria sia causando la deplezione dal microambiente di triptofano, che è necessario ai linfociti T per proliferare ed espandersi, sia producendo metaboliti che possono causare l'apoptosi dei linfociti T. La rimozione del triptofano dall'ambiente cellulare porta all'arresto del ciclo cellulare con conseguente morte delle cellule effettrici. Inoltre, i prodotti di degradazione (tra cui la chinurenina stessa) possono inviare alle cellule adiacenti segnali anti-proliferativi. Questo enzima è in grado di ridurre l'espressione di CD80 e CD86 nelle APCs. Poichè queste due molecole costimolatorie interagiscono con il CD28 (recettore coinvolto nell'attivazione dei linfociti T), la diminuzione della loro espressione comporta un calo nella

stimolazione delle cellule T-effettrici (Vignali, 2008). In realtà, studi recenti suggeriscono che LAG3 (Lymphocyte Activation Gene 3, detto anche CD223) è coinvolto nel blocco della maturazione di DCs. LAG3 è un omologo del CD4 che lega le molecole MHC-II con grande affinità, possiede intrinsecamente una funzione regolatrice ed è richiesto per la massima attività soppressoria dei Tregs (Workman, 2005; Huang, 2004).

Le cellule T-effettrici hanno un ruolo importante nel potenziamento dell'attività soppressoria dei Tregs: le interazioni ligando/recettore tra cellule effettrici CD4<sup>+</sup> messe in cocoltura con Tregs danno inizio ad una cascata di eventi in cui l'IL-2 sembra avere un ruolo importante (Thornton, 2004), in quanto induce il rilascio di IL-35 e potenzia l'attività regolatoria stessa. Infatti, lo studio dei profili genetici dei Tregs attivati, in presenza o assenza di cellule bersaglio, sembra suggerire che l'interazione tra le due popolazioni cellulari incrementi l'espressione di altre proteine regolatorie (Vignali, 2008).

Questa popolazione, quindi, è in grado di inibire la proliferazione e l'attivazione di altri linfociti T: grazie a tale proprietà i Tregs potrebbero rappresentare un possibile strumento prezioso in clinica, ad esempio, nella cura delle malattie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto di trapianto.

### ***Tregs e linfociti B***

I linfociti B, ed in particolare le plasmacellule, sono le cellule responsabili della produzione di anticorpi, ma hanno un ruolo importante anche per quanto riguarda il mantenimento di una situazione di equilibrio nel sistema immunitario. Infatti, queste cellule sono richieste per l'attivazione ottimale di linfociti T CD4<sup>+</sup> poiché, tramite uno specifico recettore, possono internalizzare, processare ed, infine, presentare antigeni alle cellule T (André, 2009).

Il controllo della funzionalità delle cellule B sembra, quindi, essere un fattore importante nel mantenimento della tolleranza al *self* operato dai Tregs, i quali

controllano il pool di antigeni presentati dai linfociti B, sia *in vitro* che *in vivo*, inducendo apoptosi (tramite perforine e granzimi) nelle cellule B antigene-specifiche (Zhao, 2006; Ludwig-Portugall, 2008). Il *recruitment* tramite la chemochina CCL-4 (Chemokine C-C motif Ligand-4) di Tregs nelle aree linfoidi secondarie dove risiedono i linfociti B può sopprimere le risposte B indotte dalle cellule T, *in vivo*, sia ad antigeni *self* che estranei; al contrario, un difetto in questo sistema di *recruitment* può portare ad autoimmunità con conseguente risposta umorale anomala ed eccessiva agli antigeni target (Bystry, 2001; Eddahri, 2006). L'attività immunosoppressoria dei Tregs sulla produzione di immunoglobuline da parte delle cellule B è esercitata in modo contatto-dipendente con il coinvolgimento del TGF- $\beta$ 1 (Lim, 2005; Nakamura, 2001), del sistema CD40L-CD40 (molecole costimolatorie, la prima espressa da vari tipi cellulari, tra cui cellule T, la seconda da APCs) e delle interazioni tra i complessi MHC-II (Hervé, 2007).

### *Tregs e monociti/macrofagi*

Monociti e macrofagi hanno un ruolo sia nell'immunità innata che in quella acquisita. In particolare, intervengono in diverse funzioni chiave tra cui il riconoscimento di antigeni estranei tramite recettori specifici, la fagocitosi e l'eliminazione degli antigeni, la processazione e l'esposizione dei peptidi derivati dagli antigeni stessi (tramite MHC-II) a cellule T CD4<sup>+</sup>, la secrezione di un ampio range di citochine e chemochine immunoregolatorie (André, 2009).

Si possono identificare due sottopopolazioni di macrofagi: l'avvio del processo infiammatorio è determinato dai macrofagi M1, che producono livelli elevati di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno. I macrofagi M2 sono, invece, responsabili della fase risolutiva del processo infettivo; essi

producono citochine anti-infiammatorie e possiedono una notevole attività fagocitaria (Mosser, 2003; Ehrchen, 2007; Weaver, 2007).

Esperimenti *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che i Tregs esercitano effetti soppressori diretti su monociti e macrofagi, influenzando poi la successiva risposta immunitaria (innata e/o acquisita). Cocolture delle due popolazioni cellulari evidenziano una ridotta espressione in cellule monocitarie di molecole MHC-II, CD40, CD80 e CD86, nonché una ridotta produzione di citochine infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF e CCL-3), a confronto con la stimolazione macrofagica da parte di cellule T-effettrici (Taams, 2005; Mahajan, 2006; Tiemessen, 2007). I Tregs, inoltre, tramite un meccanismo pro-apoptotico che coinvolge la via Fas/FasL, limitano la sopravvivenza lipopolisaccaride-indotta nei monociti (Venet, 2006). Nonostante gli esperimenti *in vivo* evidenzino che IL-10 e TGF $\beta$  derivati dai Tregs sopprimono le risposte immunitarie innate (Maloy, 2003), è stato dimostrato che sotto lo stimolo di cellule regolatorie, la produzione di IL-10 da parte di cellule macrofagiche può aumentare e stimolare in maniera autocrina l'espressione di B7-H4 (proteina inibitoria della crescita cellulare in cellule T). I monociti "condizionati" dai Tregs sono scarsi stimolatori di cellule T, e l'aumentata espressione di B7-H4 può contribuire parzialmente a tale inibizione (Taams, 2005; Kryczek, 2006). Quindi, in base a queste affermazioni, i Tregs modulano l'attivazione di monociti e macrofagi, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi tissutale.

### ***Tregs nelle malattie autoimmuni***

Evidenze sperimentali in modelli animali dimostrano che numerose patologie autoimmuni insorgono inseguito all'alterazione quantitativa e/o qualitativa dei Tregs. In particolare, Sakaguchi et al. hanno infuso cellule T prive di questa popolazione in topi timectomizzati ed hanno notato l'insorgenza di

autoimmunità (coliti, gastriti, diabete autoimmune insulino-dipendente e tiroiditi); al contrario, l'infusione di cellule T, Tregs inclusi, è in grado di prevenire l'autoimmunità (Baecher-Allan, 2004).

Nella Sclerosi Multipla (MS), una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da infiltrazione ed infiammazione, da parte di linfociti, della materia bianca del sistema nervoso centrale, non sono state osservate variazioni nella frequenza di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> circolanti (Viglietta, 2004). È stato, invece, osservato che i Tregs dei pazienti avevano un'attività soppressoria inferiore rispetto ai controlli normali (Baecher-Allan, 2004).

Anche in soggetti affetti da Artrite Reumatoide (RA), un'infiammazione cronica che provoca distruzione dell'architettura delle articolazioni, nella quale, probabilmente, svolgono un ruolo notevole le citochine, il numero dei Tregs non è significativamente modificato rispetto ai controlli sani (Ehrenstein, 2004); tuttavia, uno studio successivo ha evidenziato che il loro numero è superiore nel liquido sinoviale di pazienti con RA rispetto ad individui sani (Baecher-Allan, 2004). In questi pazienti non sono state osservate, inoltre, significative differenze per quanto riguarda l'attività soppressoria dei Tregs, anche se queste cellule non erano in grado di inibire la produzione di citochine in cellule T convenzionali (Ehrenstein, 2004).

Nella Sindrome Polighiandolare Autoimmune di tipo II (APS-II), caratterizzata da molteplici alterazioni a livello endocrino, dovute ad un processo autoimmune che scaturisce dalla manifestazione della malattia di Addison, diabete di tipo I o malattia autoimmune a carico della tiroide (Lan et al., 2005), i Tregs non sono variati nel numero, mentre la funzione soppressoria risulta ridotta rispetto ai controlli (Kriegel, 2004).

Una situazione analoga è quella della Miastenia Grave, una tipica malattia autoimmune CD4<sup>+</sup>-dipendente, mediata da auto-anticorpi contro il recettore per l'acetilcolina (Lan, 2005). Non ci sono differenze significative riguardanti la concentrazione di Tregs nel sangue periferico di pazienti e soggetti sani, ma gli

studi di proliferazione hanno dimostrato che questa popolazione cellulare, negli individui con Miastenia Grave, è incapace di sopprimere la proliferazione delle cellule T-effettrici; inoltre la quantità di mRNA per Foxp3 nei Tregs risultava due volte ridotta nei pazienti rispetto ai controlli (Balandina, 2005).

Nella Malattia di Kawasaki, che colpisce i linfonodi, le membrane mucose ed il cuore di bambini sotto i 5 anni manifestandosi come vasculite (Lan, 2005), i pazienti con la patologia in fase acuta manifestano una frequenza significativamente più bassa di Tregs nel sangue periferico, analogamente ai livelli di mRNA per Foxp3, rispetto ai controlli sani (Furuno, 2004).

Il paziente malato di Diabete di tipo I, patologia che è il risultato della distruzione autoimmune cronica di cellule del pancreas di tipo  $\beta$ , presenta un numero di Tregs significativamente più basso sia nei soggetti di recente diagnosi che non, rispetto ai controlli ed a diabetici di tipo II (Roncarolo, 2001; Kukreja, 2002). E' stato, inoltre, osservato un forte deficit nell'attività soppressoria di queste cellule (Lindley, 2005).

Nel caso del Lupus Eritematoso Sistemico, una malattia autoimmune cronica che prevede iperreattività di cellule B e difetti nei processi linfoidi e nella produzione di citochine, è stato riportato un numero più basso di Tregs circolanti rispetto ai controlli (Crispin, 2003). Anche l'espressione del Foxp3 (mRNA) risulta ridotta in questi pazienti (Mudd, 2006).

Infine, in soggetti con Psoriasi (patologia autoimmune caratterizzata da lesioni epiteliali tipiche, dovute a iperproliferazione di cheratinociti e cellule endoteliali, infiltrazione di granulociti, cellule T attivate ed APCs) la popolazione di Tregs non risulta numericamente ridotta rispetto ai soggetti sani. Tuttavia, la capacità soppressoria di questa popolazione linfocitaria risulta significativamente inferiore nei pazienti (Sugiyama, 2005).

Pur essendo nota l'importanza dei Tregs nell'eziologia di malattie autoimmuni, il loro coinvolgimento in altre patologie non può essere ignorato:

varie infezioni croniche causate da virus, batteri e parassiti, prevedono un blocco dell'attività patogena, dovuto agli effetti immunosoppressivi dei Tregs su quelli che sono i principali bersagli dei patogeni stessi; basti pensare, ad esempio all'importanza di cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> per il virus HIV (Lan, 2005).

### *Tregs nella PTI*

E' stato ipotizzato che la riduzione del numero dei Tregs e/o della loro funzionalità può contribuire alla mancata tolleranza al *self* in pazienti con PTI, così come è stato dimostrato per altre patologie autoimmuni.

Sakakura et al. hanno dimostrato che il numero assoluto dei Tregs, identificati come cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, nei pazienti con PTI risulta ridotto rispetto ai soggetti sani, soprattutto se la malattia è in fase severa. Parallelamente, l'espressione dell'mRNA per Foxp3 risulta ridotto nelle cellule mononucleate dei pazienti rispetto ai controlli (Sakakura, 2007).

Da uno studio condotto da Liu et al. è emerso che sia la percentuale di Tregs, identificati come cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, che la loro attività soppressoria sono significativamente ridotte in pazienti con PTI attiva rispetto ai pazienti in remissione, mentre non ci sono differenze nelle percentuali di queste cellule tra pazienti e soggetti sani. Lo stesso studio riporta inoltre che non c'è alcun tipo di correlazione tra percentuale di Tregs e parametri clinici quali sesso, età, durata della malattia, conta piastrinica e parametri di trattamento (Liu, 2007).

Uno studio condotto da Ling et al. rileva che la percentuale di Tregs, identificati come cellule CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, è significativamente ridotta nei pazienti con PTI, soprattutto se la malattia è in fase cronica. I dati riportano, inoltre, che la frequenza dei Tregs risulta inversamente correlata al numero assoluto di DCs mieloidi e plasmacitoidi, suggerendo che i meccanismi di interazione tra queste due popolazioni cellulari possono essere coinvolti nella patogenesi della PTI (Ling, 2007).

Una recente pubblicazione di Stasi et al., conferma che il numero assoluto e la percentuale di Tregs, identificati come cellule CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, sono ridotti in pazienti con PTI rispetto a soggetti sani, che non esiste alcuna correlazione tra il numero o la percentuale di queste cellule e i parametri clinici e che l'attività soppressoria è significativamente ridotta nei Tregs dei pazienti rispetto a individui di controllo (Stasi, 2008).

Al contrario, Yu et al. non hanno rilevato differenze statisticamente significative, tra pazienti con PTI e soggetti sani, né nella frequenza dei Tregs (identificati come cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>) né nell'espressione di Foxp3. Tuttavia, i dati sulla ridotta attività soppressoria dei Tregs nei pazienti confermano i risultati degli studi precedenti (Yu, 2008).

#### **IV. Le cellule dendritiche (DCs)**

Le cellule dendritiche svolgono un ruolo cruciale nell'induzione e nella regolazione delle risposte sia nell'immunità innata che acquisita. Sono infatti note per la loro capacità unica di presentare gli antigeni e per la loro abilità nell'attivare i linfociti T *naive* (McLellan, 1995; Banchereau, 2000). Le DCs immature risiedono nei tessuti periferici, dove catturano e processano gli antigeni per la loro presentazione su molecole HLA. Gli agenti microbici, gli stimoli infiammatori o gli stimoli derivati dalle cellule T inducono una serie di cambiamenti morfologici, fenotipici e funzionali che vengono comunemente raggruppati sotto il nome di "processo maturativo" e che servono a rendere le DCs capaci di attivare efficacemente i linfociti T attraverso l'interazione con le molecole di costimolazione (Cella, 1996; Engering, 1997). Le DCs immature non sono capaci di generare un *signalling* co-stimolatorio, ma inducono una risposta tollerogena e causano anergia delle cellule T (Jonuleit, 1996). Attratte

dalle chemochine linfoidi, le DCs mature migrano nell'area delle cellule T nei linfonodi, dove danno inizio alla risposta immunitaria (Randolph, 2005).

Esistono vari sottotipi di DCs umane, che possono essere identificate in base (1) alla localizzazione (tessuti periferici, tessuti linfoidi, sangue), (2) alla sorgente (derivate *in vitro* da monociti o da cellule CD34<sup>+</sup>) e (3) al fenotipo (ad esempio Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>/-).

Inizialmente le Dcs sono state identificate come cellule interstiziali HLA-DR<sup>+</sup> nel rene (Williams, 1980). Successivamente popolazioni diverse di DCs sono state descritte nelle tonsille (Prickett, 1992), nel timo (Inaba, 1983), nel fegato (Prickett, 1988), nell'interstizio di organi non linfoidi (Hart, 1989) e nel midollo osseo (Egner, 1993).

Tutte le DCs esprimono HLA-DR e sono Lin<sup>-</sup>, ovvero non esprimono nessuno dei marcatori di lineage (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56). Le CD1c<sup>+</sup>-DCs sono caratterizzate dall'espressione di CD1c e CD11c (MacDonald, 2002); le DCs plasmacitoidi (pDC) dall'espressione di CD123, CD303 e CD304 (Dzionek, 2000; Olweus, 1997; Blomberg, 2003); le CD141<sup>+</sup>-DCs dall'espressione di CD141 (MacDonald, 2002); le CMRF-44<sup>+</sup>-DCs dall'espressione di CMRF-44 e CMRF-56 (Lopez, 2003; Vuckovic, 2003); le CD83<sup>+</sup>-DCs dall'espressione di CD83; le cellule di Langerans (LC) dall'espressione di CD1a e CD207 (Caux, 1996; Valladeau, 2000), le DCs dei tessuti linfoidi e delle mucose dall'espressione di CD209 e CD103 (Ochoa, 2008; Del Rio, 2010).

Un altro modo per identificare i subset di DCs è quello di individuarle in base al tessuto di appartenenza o sorgente cellulare di derivazione. Secondo questa classificazione esistono: a) DCs monocitoidi che esprimono CD14 e possono o meno esprimere CD16 (Ziegler-Heitbrock, 2007; Geissmann, 2003); b) DCs del sangue a cui appartengono 5 diverse sottopopolazioni: le DCs esprimenti il CD34, le DCs esprimenti il CD141, le DCs esprimenti il CD16 (Randolph, 2002), le DCs mieloidi (CD1c<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>) (O'Doherty, 1994) e le DCs plasmacitoidi (CD4<sup>+</sup>CD123<sup>++</sup>CD303<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup>). Inoltre esistono DCs

appartenenti a tessuti linfoidei e non linfoidei. Alla prima classe appartengono le DCs delle tonsille (Summers, 2001), le DCs dei linfonodi (CD103<sup>+</sup>), le DCs del timo (CD123<sup>++</sup>) (Res, 1999) e le DCs della milza (McIlroy, 2001); alla seconda le cellule di Langerans (LC) (Romani, 2010) e le cellule del derma (DCs del derma) (Lenz, 1993). Le sorgenti più utilizzate per studiare le DCs sono i precursori CD14<sup>+</sup> o CD34<sup>+</sup>. Le DCs derivate dai monociti CD14<sup>+</sup> possono differenziarsi sia spontaneamente (Ho, 2002) che in presenza di citochine (Sallusto e Lanzavecchia, 1994); le DCs derivate dalle cellule CD34<sup>+</sup> di midollo osseo, cordone ombelicale o di sangue periferico dopo mobilitazione si differenziano unicamente in presenza di citochine (Caux, 1996).

### *DCs e induzione della tolleranza: il ruolo di IDO*

Numerose evidenze hanno rilevato la capacità delle stesse DCs di indurre un fenomeno di tolleranza, piuttosto che di attivazione, in risposta alla presentazione di antigeni sulla loro superficie cellulare (Steinman, 2003). Le DCs assumono, quindi, un ruolo chiave nelle risposte immunitarie, in quanto sono capaci di indurre attivazione della risposta o tolleranza a seconda delle circostanze.

I due possibili meccanismi di azione delle DCs richiedono l'integrazione di diversi segnali prodotti dall'immunità innata e acquisita. L'informazione può essere passiva: l'assenza di segnali che indicano infezione o danno causa una presentazione tollerogena dell'antigene da parte delle DCs immature. L'immunità innata può promuovere attivazione immunitaria tramite il legame dei Toll-Like Receptors (recettori presenti su cellule dell'immunità innata che, se attivati, inducono un meccanismo infiammatorio) sulla superficie delle DCs o tramite la secrezione di citochine infiammatorie oppure può promuovere tolleranza attraverso la creazione di un *milieu* locale immunosoppressivo, caratterizzato dalla presenza di citochine anti-infiammatorie, o attraverso

segnali tollerogenici per le DCs. L'immunità specifica può indurre attivazione attraverso i linfociti T helper CD4<sup>+</sup>, che supportano la risposta effettrice T cellulare, e può indurre tolleranza tramite specifici segnali rilasciati da sottopopolazioni di linfociti T definiti regolatori, quali CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e TR1. Le DCs immature e le DCs plasmacitoidi sono in grado di indurre tolleranza attraverso il differenziamento di linfociti T *naive* in Tregs.

Diversi tipi cellulari esprimonoIDO e la sua espressione è regolata da segnali derivanti dalle cellule del sistema immunitario. IDO fu scoperto dal gruppo di Hayaishi nell'intestino di coniglio come una diossigenasi contenente un gruppo eme, che mostrava specificità per un'ampia varietà di indoleamine tra cui l'L-triptofano e la serotonina (Yasui, 1986).

IDO è espresso, in maniera costitutiva o inducibile, nel citoplasma di cellule della placenta, del polmone, del piccolo e grande intestino, del colon, della milza, del fegato, del rene, dello stomaco e del cervello. Può essere indotto dall'IFN- $\gamma$  nelle cellule del *lineage* mieloide (DCs, monociti, macrofagi e eosinofili), nelle cellule epiteliali, nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali e in alcune linee tumorali (Honig, 2004; Musso, 1994; Munn, 2002).

Per ciò che concerne l'espressione di IDO da parte di cellule del sistema immunitario o implicate nella regolazione della risposta immunitaria, ciò che si è osservato è che, mentre monociti umani esprimono livelli quasi impercettibili della proteina, macrofagi (derivati *in vitro* da monociti), upregolano IDO dopo esposizione all'IFN- $\gamma$ . Inoltre, DCs ottenute *in vitro* da monociti esprimono costitutivamente la proteina anche se funzionalmente inattiva e necessitano dell'esposizione all'IFN- $\gamma$  per mostrare la presenza di una forma funzionalmente attiva (Jurgens, 2009). *In vitro*, sia nei macrofagi che nelle DCs, l'espressione di IDO è comunque limitata ad una specifica sottopopolazione di cellule non aderenti che coesprime il CD123 (catena  $\alpha$  del recettore per IL-3) ed il recettore chemochinico CCR6. Non tutte le cellule CD123<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> esprimono comunque IDO e non è ancora stato identificato un

marker specifico che consenta di isolare *in vitro* sottopopolazioni di DCs IDO<sup>+</sup> (Terness, 2005).

Moltissimi studi finora condotti inducono a concludere che soltanto alcuni tipi di DCs esprimano normalmente IDO *in vivo*. Secondo il modello proposto da Munn (Mellor e Munn, 2004), l'espressione di IDO da parte delle DCs non sarebbe comunque legata al loro stato di maturazione. Poiché alcune DCs mature mantengono espressione di IDO e proprietà tollerogeniche, maturazione ed espressione di IDO possono, probabilmente, essere due eventi indipendenti l'uno dall'altro. Esisterebbero pertanto due pathways alternativi di maturazione delle DCs esprimenti IDO: da un lato segnali pro-infiammatori, quali CD40L o citochine pro-infiammatorie, indurrebbero, oltre alla maturazione, la diminuita espressione di IDO; dall'altro segnali tollerogenici, quali l'interazione di CTLA-4 con CD80/CD86, favorirebbero il differenziamento di DCs mature esprimenti IDO, in grado di sopprimere la risposta T-cellulare. Inoltre, le DCs umane possono esprimere costitutivamente la proteina IDO senza mostrare alcuna attività enzimatica sino a quando non vengono attivate mediante esposizione all'IFN- $\gamma$  o con i ligandi di CD80/CD86. La necessità di una stretta regolazione dell'attività dell'enzima è facilmente intuibile se si considerano i potenziali effetti tossici, consistenti nella deplezione di triptofano, derivanti da un'espressione costitutiva ad alti livelli della proteina funzionalmente attiva.

Il gene *IDO* è indotto, a livello trascrizionale, in risposta a specifici stimoli infiammatori. L'interferone di tipo II (IFN- $\gamma$ ) rappresenta il principale induttore di IDO sia *in vitro* che *in vivo*. Esistono altri stimoli infiammatori che possono indurre IDO (Takikawa, 2005; Thomas, 1999; Mellor e Munn, 2004) come ad esempio l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  e il lipopolisaccaride (LPS), anche se sono meno efficaci dell'IFN- $\gamma$ . È stato dimostrato, inoltre, che IDO può essere indotto in DCs dal CTLA-4, in modo dipendente o indipendente dalla sintesi autocrina di IFN- $\gamma$  dipendente da NF-kB (Mellor e Munn, 2004; Grohamann,

2003). L'espressione diIDO può essere inoltre modulata, in maniera dipendente dal tipo cellulare e dall'ambiente citochinico, da altre molecole come IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2, CD40, il soppressore del signalling 3 delle citochine (SOCS3), la proteina codificante l'adattatore BAR (Bin1) e DAP12. Complessivamente, tutti questi dati mettono in evidenza come l'espressione diIDO sia il risultato dell'integrazione di una molteplicità di segnali intra ed extra-cellulari, ancora non completamente delineati, molti dei quali implicati nella regolazione delle risposte infiammatorie. Una volta espresso e attivato, IDO depleta l'L-triptofano dal microambiente tissutale circostante e promuove la formazione dei metaboliti della via delle chinurenine.

E' ormai assodato che IDO abbia un ruolo fondamentale nelle due fasi principali di controllo della risposta immunitaria: da una parte contribuisce alla soppressione inappropriata delle risposte durante la crescita tumorale; dall'altra è coinvolto nel tentativo di controllo di risposte eccessive nell'immunopatologia associata alle infezioni, all'autoimmunità, all'aborto mediato dal sistema immunitario e al rigetto di trapianti (Figura C).

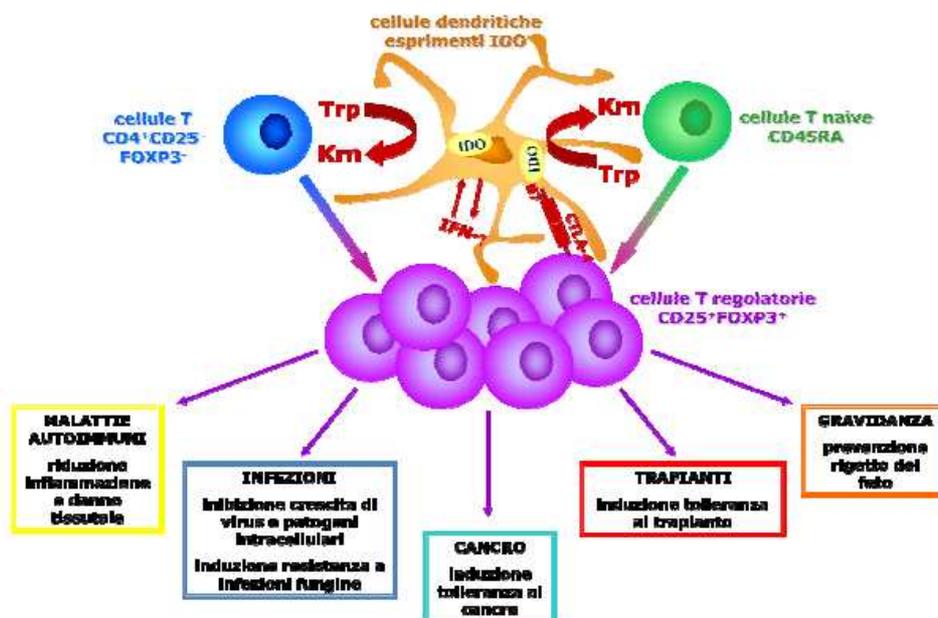


Figura C. Funzione biologica di IDO

### *Meccanismi di soppressione della risposta T cellulare mediati da IDO*

Sono stati descritti diversi effetti derivanti dall'espressione di IDO che hanno portato alla formulazione di almeno tre differenti modalità attraverso le quali esso può avere un effetto immunosoppressivo. Tali meccanismi, che probabilmente possono agire anche contemporaneamente, comprendono: (1) un'azione diretta sui linfociti T, (2) effetti indiretti mediati dalle APC e (3) un effetto bystander (Mellor e Munn, 2004).

1) Effetti diretti sui linfociti T: l'ipotesi più semplice tra quelle avanzate per spiegare l'effetto immunomodulante di IDO è che la deplezione di triptofano, conseguente all'espressione della proteina, arresti le cellule T nella fase G1 del ciclo cellulare, impedendone l'espansione clonale e rendendole più sensibili a segnali proapoptotici (Munn, 1999). In una serie di studi condotti su modelli murini, Munn (2002) ha dimostrato che i linfociti T, attivati *in vitro* in un mezzo privo di triptofano, pur progredendo nel ciclo cellulare dalla fase G0 alla fase G1, non entrano nella fase S. Inoltre tali linfociti risultano maggiormente suscettibili all'apoptosi mediata dall'attivazione di Fas (Fallarino, 2002). Resta ancora da chiarire come la deplezione di triptofano sia in grado di sortire tali effetti. Alcuni Autori inoltre hanno avanzato dei dubbi sull'esistenza di tale meccanismo, poichè non si è osservata alcuna inibizione della proliferazione T-cellulare nemmeno con una completa deplezione di triptofano (Harding, 2003). Pertanto si è ipotizzata l'esistenza di un meccanismo alternativo come l'accumulo di una grande quantità di prodotti del catabolismo del triptofano, attraverso il quale l'attività di IDO possa avere un effetto tossico sui linfociti T e determinare in tali cellule un arresto del ciclo cellulare (Terness, 2002). Il gruppo di Munn (Sharma, 2007) ha pertanto proposto che tale fenomeno possa essere ottenuto attraverso una conversione del fenotipo di cellule T, arrestate in G1, a cellule T con fenotipo regolatorio indotto dall'attività dell'enzima. Sembra, infatti, che le DCs IDO<sup>+</sup> possano

favorire uno stato generale di tolleranza, favorendo lo sviluppo di Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, secernenti IL-10.

2) Effetti indiretti mediati dalle APC: un'ipotesi alternativa è che IDO possa alterare le proprietà biologiche delle APC che esprimono la proteina diminuendone la capacità di presentare l'antigene, aumentandone l'espressione di ligandi soppressivi (B7H1 o il ligando di CD95) o favorendo il rilascio di citochine immunoregolatriche quali IL-10 o TGF- $\beta$  (Mellor e Munn, 2004). Anche in questo caso, l'espressione di IDO, avrebbe un effetto immunomodulante, in quanto favorirebbe l'instaurarsi di una tolleranza verso gli antigeni presentati dalle stesse APC IDO<sup>+</sup>.

3) Effetto bystander: gli studi *in vitro* ed *in vivo* hanno mostrato come l'effetto soppressivo di IDO sia dominante e l'espressione della proteina possa inibire la risposta T-cellulare anche nei confronti di antigeni presentati da APC non immunosoppressive (IDO<sup>-</sup>) vicine. Infatti, quando due popolazioni di DCs IDO<sup>+</sup> e IDO<sup>-</sup> vengono coltivate insieme, le DCs IDO<sup>+</sup> sopprimono in modo dominante la proliferazione T cellulare antigene-specifica con intensità dipendente dai livelli di espressione di IDO. Tale meccanismo d'azione è mediato da IDO in quanto può essere rimosso con l'aggiunta del suo inibitore specifico, l'1-MT (Munn, 2004). L'effetto soppressorio *bystander* è però soltanto locale e potrebbe essere dovuto sia agli effetti dell'attività dell'enzima sul microambiente (deplezione di triptofano, accumulo di metaboliti tossici, presenza di citochine regolatorie) sia ad un effetto diretto delle cellule esprimenti IDO, che potrebbero indurre, in APC IDO<sup>-</sup>, l'espressione di fattori immunomodulanti.

### ***DCs nella PTI***

Catani et al. hanno recentemente dimostrato che, nei pazienti con PTI, le DCs, pre-pulsate con piastrine autologhe/allogene, sia fresche che invecchiate,

sono più efficienti nella stimolazione della proliferazione delle cellule T-effettrici autologhe rispetto alle DCs di individui sani. Hanno osservato, inoltre, che le piastrine da sole non sono in grado di indurre proliferazione linfocitaria. Questi risultati possono essere correlati al fatto che la molecola costimolatoria CD86 risulta iperespressa nelle DCs di pazienti con PTI (Catani, 2006). Come noto, il CD86 è una molecola costimolatoria espressa sulle DCs attivate che stimola la proliferazione dei linfociti T e B.

In questo studio abbiamo, quindi, cercato di chiarire perché le cellule dendritiche dei pazienti mostrano un fenotipo più maturo e se questa alterazione funzionale delle DCs può causare una risposta patogenetica.

## **V. “Cross-talk” tra Tregs e DCs**

Recenti studi hanno dimostrato che esiste un “cross-talk” fra Tregs e DCs e che tale interazione è di tipo bidirezionale.

Come detto in precedenza, i Tregs rappresentano una classe di linfociti nota per la capacità immunosoppressiva. Diversi studi hanno dimostrato il coinvolgimento di IDO come possibile meccanismo effettore di tale attività. Grohmann e colleghi hanno mostrato la capacità dei Tregs di indurre, *in vitro*, l’espressione di elevati livelli della forma funzionale di IDO su DCs murine (Fallarino, 2003). Tale fenomeno sembra verificarsi in seguito al legame tra il CTLA-4 espresso sulla superficie dei Tregs con le molecole CD80 e CD86 sulle DCs: l’interazione trasduce un segnale nelle DCs che up-regola l’espressione della proteina funzionale IDO sulla superficie di queste cellule (Mellor, 2004). La capacità dell’interazione tra il CTLA-4 e le molecole CD80 e CD86 di indurre IDO è stata riscontrata anche in DCs umane di derivazione monocitaria (Munn, 2004).

Questi risultati portano ad ipotizzare il ruolo preminente del CTLA-4 espresso sui Tregs nell'induzione diIDO, che rappresenta a sua volta il meccanismo effettore tramite cui i Tregs esercitano la loro attività inibitoria.

I Tregs possono, quindi, modulare la maturazione, l'attivazione e la funzionalità di vari sottotipi di DCs murine ed umane, sia *in vitro* che *in vivo* (Figura D).

Studi *in vitro* hanno, infatti, dimostrato che i Tregs inducono la down-regolazione delle molecole costimolatorie CD80, CD86, CD40 e del complesso MHC-II sulla superficie delle DCs. Tali interazioni inducono anche l'up-regolazione di molecole inibitorie B7-H3 (proteine coinvolte nella morte programmata).

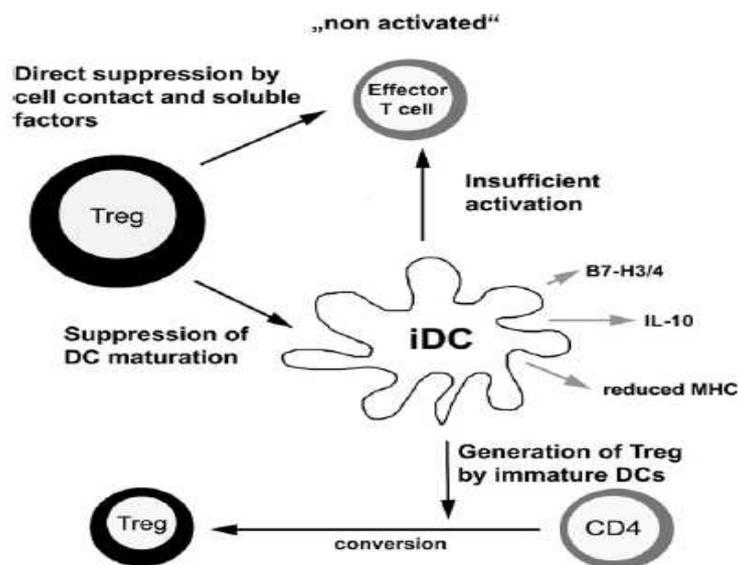


Figura D. Interazioni tra Tregs e DCs.

Da Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol*, 2007; 250(1-2):1-13.

Inoltre, i Tregs sembrano ridurre in maniera significativa la produzione di varie citochine pro-infiammatorie associate alle DCs, tra cui IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, mentre aumentano l'espressione della citochina anti-infiammatoria IL-10 (Andrè, 2009). E' stato anche dimostrato, *in vivo*, che i Tregs esercitano un effetto precoce sulla risposta immunitaria impedendo la formazione di legami stabili e diretti tra DCs e cellule T *naive* (Tang, 2006; Tadokoro, 2006).

Tali meccanismi di interazione e modulazione con i Tregs favoriscono quindi l'acquisizione, da parte delle DCs stesse, di un fenotipo tollerogenico semimatturo e l'abilità di migrare agli organi linfoidi secondari (Andrè, 2009).

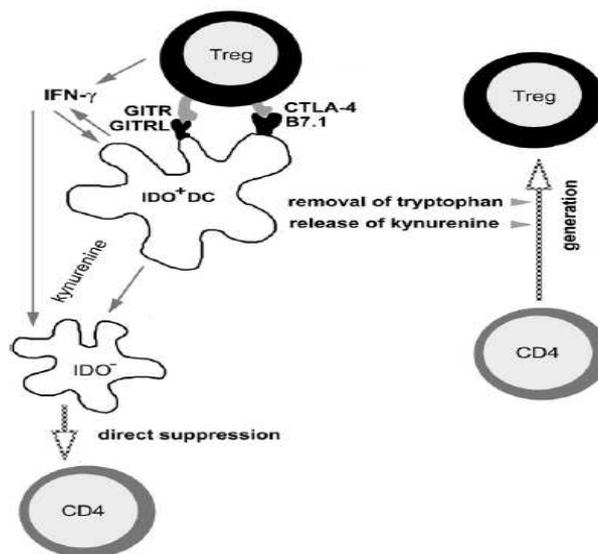
Le APCs ricevono e rispondono a stimoli ambientali forniti da molecole costimolatorie e citochine infiammatorie tramite varie vie di trasduzione del segnale a livello intracellulare, tra cui fosfatidilinositide-3 chinasi (PI3K), proteine-tirosin chinasi non recettoriali della famiglia Janus (JAK)-trasduttori del segnale ed attivatori trascrizionali (STAT), MAP chinasi (Mitogen activated Protein kinases) e NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B). Le APCs costitutivamente attivate possono sfuggire all'inibizione da parte di Tregs e generare cellule T attivate che non rispondono al meccanismo soppressorio. Tutto ciò si verifica, probabilmente, per il rilascio di IL-6 indotto da Toll-Like Receptors a seguito del riconoscimento di antigeni estranei (Andrè, 2009).

Come detto in precedenza, l'interazione fra DCs e Tregs è bidirezionale. Infatti, recenti evidenze sperimentali suggeriscono che anche le DCs possono influenzare il numero e la funzionalità dei Tregs. È stato dimostrato, infatti, che grandi quantità di citochine pro-infiammatorie rilasciate dalle APCs, a seguito di un'attivazione costante e prolungata, possono rendere i Tregs funzionalmente inefficienti. Ad esempio, l'esposizione prolungata a TNF (citochina infiammatoria) può inibire la loro funzionalità attraverso un meccanismo di segnalazione che passa attraverso il recettore per TNF di tipo II, costitutivamente espresso dai Tregs e la cui espressione è stimolata da TNF (Valencia, 2006). Infatti, è stato dimostrato che nei Tregs l'inibizione, mediata da questa citochina, della loro funzionalità risulta associata alla diminuzione dell'espressione dell'mRNA e della proteina di Foxp3. Inoltre, IL-6, IL-12 ed IL-1 $\beta$  possono promuovere autoimmunità interferendo con l'attività dei linfociti Tregs stessi ed inducendo l'attivazione ed espansione di cellule T effettrici (Pasare, 2003; King, 2005; Wan, 2007). Questi dati evidenziano, quindi, un'interazione tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita, in

cui le citochine pro-infiammatorie, prodotte per risposta innata, possono promuovere la reattività immune limitando l'azione dei Tregs (Wan, 2007).

Determinate sottopopolazioni di DCs, caratterizzate dalla funzione soppressiva su cellule T e promozione del meccanismo di tolleranza del sistema immunitario, in relazione al loro stato di attivazione, esprimono IDO. Alcuni studi hanno dimostrato che DCs IDO<sup>+</sup> sono coinvolte nella generazione di Tregs nel sangue periferico a partire da cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>: è stato osservato, infatti, che il blocco di IDO inibisce lo sviluppo di questa sottopopolazione linfocitaria, mentre l'incremento dei metaboliti di IDO conduce ad un aumento del numero di Tregs (Mahnke, 2007). Studi recenti hanno indicato, inoltre, che l'espressione di IDO da parte delle DCs potrebbe promuovere *in vitro* la differenziazione di nuovi Tregs da cellule T *naive* CD4<sup>+</sup> (Curti, 2007).

Secondo quanto detto finora, i Tregs e IDO rappresenterebbero un potente sistema a feedback positivo, in cui i Tregs indurrebbero l'espressione di IDO che, a sua volta, favorirebbe lo sviluppo di nuovi Tregs. L'interazione reciproca tra Tregs e DCs consente, quindi, il corretto mantenimento della tolleranza periferica.



**Figura E. Interazioni tra Tregs e DCs.**

Da Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol*, 2007; 250(1-2):1-13.

## V. I linfociti Th17

I linfociti Th17 sono cellule T effettrici CD4<sup>+</sup> caratterizzate dalla produzione costitutiva di IL-17, citochina coinvolta nel meccanismo pro-infiammatorio; in base alla popolazione cellulare target, l'IL-17 può indurre il rilascio di chemochine, metalloproteasi, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Inoltre, l'IL-17 è in grado di mobilitare e attivare i neutrofili. Da diversi studi è emerso che i linfociti Th17 sono coinvolti nella protezione contro diversi patogeni extra-cellulari, tra cui batteri e funghi, ma sono anche implicati nei processi di infiammazione tissutale e nell'induzione e progressione di numerose patologie autoimmuni quali artrite reumatoide, sclerosi multipla, scleroderma sistemico e psoriasi (Harrington, 2005; Romagnani, 2009; Afzali, 2007).

La produzione costitutiva di IL-17 e di IFN- $\gamma$  viene utilizzata come criterio per identificare i linfociti Th17 (Annunziato, 2007). Recentemente è stato dimostrato dal gruppo di Cosmi et al. che la popolazione cellulare del sangue periferico, che è CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup>, è particolarmente arricchita in linfociti Th17. Questa popolazione linfocitaria è costituita, infatti, da cellule CD4<sup>+</sup> che esprimono costitutivamente il CD161 (glicoproteina di membrana espressa da cellule Natural Killer e da linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>; può fungere da recettore specifico di alcune cellule target delle NK) e il CD196 o CCR6 (CC-chemokine receptor 6; è un recettore chemochinico coinvolto nella migrazione di Tregs e linfociti Th17 nei siti di infiammazione). Altri marcatori caratteristici dei linfociti Th17 sono ROR $\gamma$ t (recettore ed attivatore trascrizionale relazionato all'espressione di Acido Retinoico) e IL23R (recettore per l'IL-23, coinvolto nel differenziamento dei linfociti Th17) (Annunziato, 2008). Le principali citochine prodotte dai linfociti Th17 sono l'IL-6 ed il TGF- $\beta$  (Ma, 2008). Il differenziamento dei linfociti Th17 richiede, infatti, l'azione sinergica di TGF- $\beta$  ed IL-6 (Bettelli, 2006; Veldhoen, 2006). Il TGF- $\beta$  è una citochina anti-infiammatoria necessaria anche per la sopravvivenza e la funzione dei Tregs Foxp3<sup>+</sup> (Marie, 2005; Marie, 2006). Questa relazione reciproca, tra la

generazione dei linfociti Tregs e quella dei linfociti Th17, suggerisce un nuovo paradigma nel differenziamento delle cellule T dove i due fattori antagonizzano l'uno le funzioni dell'altro. E' stato inoltre dimostrato che l'IL-2, indispensabile per i Tregs, inibisce lo sviluppo dei linfociti Th17 (Fontenot, 2005). In aggiunta, è emerso che anche l'acido retinoico, un metabolita della vitamina A, regola il bilanciamento dei Tregs ed inibisce la generazione di linfociti Th17, mediata dall'IL-6 (Mucida, 2007). Queste osservazioni suggeriscono che la produzione di Tregs e di linfociti Th17 siano collegate e che la generazione dell'una o dell'altra popolazione dipenda dall'*input* citochinico che le cellule CD4<sup>+</sup> ricevono (Awasthi, 2008). Questa relazione è stata, anche, recentemente confermata a livello molecolare: Foxp3 e ROR $\gamma$ t risultano fisicamente associati ed inibiscono rispettivamente le funzioni l'uno dell'altro (Zhou, 2008). Un'altra citochina che si è dimostrata avere un ruolo notevole in questo ambito è l'IL-21; essa è principalmente prodotta dai linfociti Th17 e ne stimola il differenziamento, ma allo stesso tempo inibisce la generazione (mediata da TGF- $\beta$ ) di linfociti Tregs *de novo* (Korn, 2007; Nurieva, 2007; Zhou, 2007).

Alcuni studi recenti hanno cercato di chiarire il ruolo dei Th17 nella PTI, ma i risultati riportati sono piuttosto contrastanti. Infatti, mentre alcuni Autori hanno riportato una percentuale aumentata di Th17 nel sangue periferico di pazienti con PTI (Zhang, 2009; Zhu, 2010), il gruppo di Guo et al. ha riscontrato, tramite citofluorimetria, la stessa frequenza di Th17 circolanti e, tramite RT-PCR, un'espressione comparabile di trascritti di IL-17 tra pazienti e controlli (Guo, 2009). Inoltre, in questi studi le cellule Th17 sono state caratterizzate dopo stimolazione delle cellule mononucleate con varie molecole (PMA e ionomicina) e, quindi, non in condizioni fisiologiche. Inoltre, è stato dimostrato che i livelli plasmatici di IL-17 sono simili tra pazienti con PTI e soggetti sani (Zhu, 2010; Ma, 2008). Risulta, quindi, evidente la necessità di approfondire la caratterizzazione di questo *subset* linfocitario nella PTI.

## SCOPO DELLA TESI

I dati pubblicati fino ad ora sulla caratterizzazione dei Tregs in corso di PTI hanno descritto la ridotta frequenza e funzionalità di queste cellule. Tuttavia, per ciò che riguarda la frequenza, la maggior parte degli studi pubblicati identifica tali cellule in maniera generica, indicando soltanto la percentuale e non il valore assoluto o, ancora, viene evidenziata la presenza di cellule Foxp3<sup>+</sup> valutando l'mRNA e non la proteina. Inoltre, il marcatore CD127 non è mai stato utilizzato per identificare queste cellule. Come descritto nell'introduzione, l'interazione tra Tregs e DCs gioca un ruolo importante nella generazione della tolleranza al *self*. Tuttavia, fino ad ora, non sono stati pubblicati dati relativi all'interazione fra queste cellule in corso di PTI.

Alcuni Autori hanno studiato recentemente il ruolo dei linfociti Th17 nei pazienti con PTI, ma i risultati riportati sono piuttosto contrastanti. Inoltre, in questi studi le cellule Th17 sono state caratterizzate dopo stimolazione con varie molecole e, quindi, non in condizioni fisiologiche.

Sulla base di tali premesse, gli obiettivi principali di questa tesi sono stati: 1) caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente i Tregs nei pazienti con PTI; 2) valutare l'interazione tra Tregs e DCs nei pazienti rispetto ai soggetti sani; 3) quantificare, tramite citofluorimetria, i Th17 circolanti nel sangue periferico di questi pazienti.

In particolare, gli esperimenti effettuati sono stati finalizzati a valutare in pazienti con PTI:

- il numero assoluto dei Tregs circolanti con l'ausilio di vari marcatori fenotipici e la loro attività immunosoppressoria;
- la capacità dei Tregs di inibire la maturazione delle DCs;
- la capacità delle DCs di generare Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>;
- la frequenza dei linfociti Th17 circolanti.

## **MATERIALE E METODI**

### *Pazienti e controlli*

Sono stati studiati 46 pazienti con PTI, 16 maschi e 30 femmine, con età media di 42 anni (range 21-70). La diagnosi è stata fatta in accordo con Rodeghiero et al. e Provan et al.; i criteri diagnostici includono la presenza di piastrinopenia isolata con numero di piastrine  $<150.000/\text{mm}^3$  per almeno 6 mesi (escludendo tutte le altre cause di trombocitopenia).

I pazienti erano alla diagnosi (17 casi) o con malattia attiva (29 casi) ma lontani da terapia da almeno 2 mesi. Nessuno dei malati è stato splenectomizzato. Il numero mediano di piastrine era  $53.000/\text{mm}^3$  (range  $8.000\text{-}98.000/\text{mm}^3$ ). Il gruppo di controllo comprendeva 45 soggetti sani (15 maschi e 30 femmine).

### *Isolamento delle cellule mononucleate*

Il sangue periferico di pazienti con PTI e di soggetti normali, anticoagulato con EDTA (Etilen Diamine Tetraacetic Acid), è stato diluito 1:2 con soluzione fisiologica. Successivamente è stato stratificato su gradiente Ficoll-Hypaque (Cedarlane-Celbio, Milano, Italia) e centrifugato a 1500 rpm per 25 minuti. È stato quindi prelevato l'anello di cellule mononucleate (PBMNCs) che sono state contate con l'ausilio di un contatore elettronico.

### *Caratterizzazione e quantificazione dei Tregs*

La caratterizzazione immunofenotipica dei Tregs è stata effettuata con l'ausilio di anticorpi monoclonali (Becton Dickinson) coniugati con i fluorocromi Fluorescein Iso-Thio-Cyanate (FITC) o Phycoeritrin (PE) o Peridinin Chlorophyl Protein (PerCP). In particolare, la popolazione dei Tregs è stata caratterizzata utilizzando il seguente pannello di anticorpi: anti-human CD4 PerCP, anti-human CD25 FITC/PE, anti-human CD69 FITC, anti-human CD45RO FITC, anti-human CD45RA FITC, anti-human GITR PE, anti-human

HLA-DR PE, anti-human CTLA-4 PE, anti-human CD127 PE. Inoltre, è stata effettuata una marcatura intracellulare per l'identificazione del fattore di trascrizione Foxp3, marker specifico dei Tregs.

Dopo aver eseguito la marcatura di superficie, è stata valutata l'espressione di Foxp3 sulle PBMNCs, secondo le istruzioni del kit (PE anti-human Foxp3 Flow Kit, Biolegend, San Diego, CA, USA): il protocollo prevede che le cellule subiscano una prima fase di fissazione e permeabilizzazione, seguita poi dalla marcatura con l'anticorpo monoclonale. Brevemente, in ciascuna provetta è stato aggiunto 1mL di Fix/Perm buffer (1x); dopo 20 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente, è stato rimosso il surnatante. Dopo due lavaggi con buffer, è stato aggiunto 1mL di Perm buffer (1x). Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente al buio per 15 minuti; è stato, quindi, effettuato un lavaggio, a seguito del quale è stato eliminato il surnatante. A questo punto sono stati aggiunti 5 µL di K-isotype control (controllo negativo per Foxp3) in un tubo e 5 µL di anticorpo monoclonale anti-Foxp3 PE nell'altro. Dopo 30 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate due volte, risospese in 1 mL di buffer ed analizzate al citofluorimetro.

Le cellule sono state quindi valutate mediante analisi citofluorimetrica con il citofluorimetro FACSCantoII (Becton Dickinson) e mediante software FACSDiva; sono stati acquisiti minimo 10.000 eventi. La popolazione cellulare di interesse è stata identificata sulla base delle caratteristiche fisiche di granulosità (Side scatter - SSC) e grandezza cellulare (Forward scatter - FSC).

I linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> sono stati definiti sulla base di precedenti studi che hanno dimostrato che cellule T con capacità regolatorie rappresentano circa l'1-2% delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con la più alta espressione di CD25 (Baecher-Allan, 2001). I Tregs circolanti e generati *in vitro* sono stati, quindi, identificati come cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/negative</sup>; per entrambe le popolazioni è stato valutato il valore assoluto e la percentuale.

### ***Generazione di DCs derivate da monociti (mo-DCs)***

Le mo-DCs sono state generate *in vitro* a partire da cellule monocitarie CD14<sup>+</sup> di pazienti con PTI e di soggetti sani; i monociti sono stati ottenuti dalle MNCs utilizzando un sistema di separazione su colonna mediante biglie immunomagnetiche (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Brevemente, le cellule CD14<sup>+</sup> sono state poste in coltura per 5 giorni a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in terreno RPMI completo (RPMI 1640-Gibco, Milano, Italia) (10<sup>6</sup> cellule/mL di RPMI) addizionato con Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF 50 ng/mL, Sandoz, Basel, Switzerland) e con IL-4 (800 U/mL, Endogen, Woburn, MA, USA). Al quinto giorno è stato aggiunto LPS (Lipopolisaccaride; 1 ng/μL, Sigma Aldrich, Milano, Italia) per indurre la maturazione finale. Le mo-DCs immature (giorno 5) e mature (giorno 7) sono state poi contate in camera di Thoma con trypan blue per valutarne la vitalità e caratterizzate fenotipicamente con i seguenti anticorpi: anti-human CD14 FITC, anti-human CD80 PE, anti-human CD83 FITC, anti-human CD86 FITC/PE, anti-human CD40 FITC, anti-human HLA-DR PerCP/PE (BD Biosciences).

### ***Purificazione di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>***

Le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sono state isolate utilizzando un kit commerciale (MiniMacs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell isolation kit, Miltenyi Biotec). In breve, le PBMNCs sono state marcate (20 μL/10<sup>7</sup> cellule) con CD4<sup>+</sup> T cell Biotin-Antibody cocktail, che riconosce i seguenti antigeni: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ e CD235A. Questi marcatori permettono di individuare rispettivamente linfociti T-citotossici, cellule monocitarie, granulociti e macrofagi, linfociti B, piastrine, NK, DCs e granulociti basofili, linfociti T-citotossici non CD8<sup>+</sup>. Dopo l'incubazione di 15 minuti a +4°C, le cellule sono lavate, risospese in buffer e separate su colonna magnetica. Il principio della separazione magnetica prevede che l'anticorpo

sia legato a microbiglie magnetiche; di conseguenza, le cellule con l'antigene e l'anticorpo adeso sono trattenute durante il passaggio della sospensione cellulare attraverso la colonna di separazione sostenuta da un magnete. L'utilizzo di uno stantuffo, al termine del passaggio su colonna e di tre lavaggi successivi con il buffer, permette di raccogliere le cellule trattenute precedentemente dal magnete. In questo caso la selezione è detta "negativa", poiché le cellule che eluiscono dalla colonna sono CD4<sup>+</sup> (prive delle microbiglie adese), mentre le cellule trattenute sono CD4<sup>-</sup> (con le microbiglie adese). La popolazione cellulare CD4<sup>+</sup> è stata, poi, marcata con microbiglie sulla cui superficie è legato l'anticorpo anti-CD25 (Anti Biotin Microbeads). Dopo l'incubazione ed il lavaggio con il buffer, è stata effettuata la separazione su colonna utilizzando, in questo caso, un metodo di selezione "positiva": le cellule che eluiscono sono CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (prive delle microbiglie adese), mentre quelle trattenute dalla colonna sono CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (con le microbiglie adese). La purezza della separazione è risultata maggiore del 97% nella frazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con una contaminazione di cellule CD25<sup>+</sup> nel subset delle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> inferiore all'1%.

#### ***Generazione in vitro di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>***

Per studiare la capacità delle mo-DCs di convertire *in vitro* cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>, le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dei pazienti e dei controlli sono state messe in coltura da sole e con mo-DCs autologhe mature (10<sup>4</sup>/pozzetto) al rapporto di 10:1 in presenza di medium RPMI completo in una piastra da 96 pozzetti per 5 giorni. E' stata, quindi, valutata la percentuale di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> tramite analisi citofluorimetrica.

In esperimenti paralleli, per studiare l'effetto dell'inibizione di IDO sulla conversione *in vitro* di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>, è stata effettuata la cocoltura sopra descritta sia in presenza che in assenza di L-1MT (1-metil-L-triptofano; 1µM; Sigma Aldrich), inibitore specifico di IDO. E'

stata, quindi, valutata la percentuale di inibizione nella generazione di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> confrontando i valori dei campioni trattati/non trattati.

#### ***Valutazione dell'espressione di IDO nelle mo-DCs (RT-PCR quantitativa)***

L'RNA totale è stato estratto dalle mo-DCs immature e mature dei pazienti e dei soggetti sani utilizzando il kit Qiagen RNeasy microplus (Qiagen, Valencia, CA, USA). 0.5µg di RNA è stato usato per la retro-trascrizione con ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ed esameri random (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore (Promega Corporation). In breve, le amplificazioni sono state eseguite con ABI-PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) in un volume finale di 25 µL, utilizzando Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), primers a 0.75 µM e sonda a 1 µM per *IDO* e primers a 0.37 µM più la sonda a 1.2 µM per *ABL1*. I primers per *IDO* e *ABL1* sono i seguenti: *IDO* frw 5'-GGTCATGGAGATGTCCGTAA-3', *IDO* rev 5' -ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA-3', *IDO* probe 5'-6-FAM-CTGTTCCCTTACTGCCAACTCTCCAAGAAACTG-TAMRA-3', *ABL1* frw 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3', *ABL1* rev 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'; *ABL1* probe 5'-FAM-CCATTTTGGTTTGG GCTTCACACCATT-TAMRA-3'. Le condizioni dei cicli sono le seguenti: 50°C per 2 minuti e 95°C per 15 secondi seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. L'espressione di *IDO* è stata normalizzata sul livello di espressione di *ABL1*. I risultati sono espressi come rapporto di (numero di copie di *IDO*/numero di copie di *ABL1*)\*10.000. Tutte le ragioni di real-time PCR sono state fatte in duplicato.

#### ***Valutazione dell'attività enzimatica di IDO***

Sono stati misurati i livelli di chinurenine come indice di attività enzimatica di *IDO* mediante un saggio spettrofotometrico; in particolare, le mo-DCs sono

state raccolte, lavate e risospese in Hanks buffer arricchito con 500  $\mu\text{M}$  di L-triptofano (Sigma Aldrich) ed incubate per 4 ore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Sono stati, quindi, raccolti i surnatanti ed è stato aggiunto acido tricloroacetico al 30% (Sigma Aldrich; 2:1); la soluzione è stata vortexata e centrifugata a 8000 g per 5 minuti. Successivamente sono stati trasferiti 75  $\mu\text{L}$  di questa soluzione in una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto ed è stato aggiunto ad ogni pozzetto un volume uguale di reagente di Ehrlich (Sigma Aldrich). Ogni campione è stato caricato in triplicato; la densità ottica è stata misurata usando un lettore di piastre Multiskan EX (M-Medical, Milano, Italia) a 490 nm.

### ***Valutazione dell'attività soppressoria dei Tregs***

Al fine di valutare la capacità soppressoria dei Tregs, è stato effettuato un test di proliferazione *in vitro* (MLR - Mixed Leucocyte Reaction) allogeneico. Brevemente, sono state messe in coltura cellule T responder purificate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (10<sup>5</sup>/pozzetto) da sole o con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> autologhe irradiate (3000cGy), a vari rapporti (10:1, 20:1, 40:1, 100:1) in presenza di 10<sup>4</sup>/pozzetto PBMNCs allogeneiche irradiate (3000cGy) in piastre da 96 pozzetti con fondo rotondo. Il terreno di coltura era RPMI completo, costituito da RPMI 1640 (Gibco) addizionato con 1% di Penicillina/Streptomicina (ICN Biomedicals, Milano, Italia), 1% di Glutamina (Sigma Aldrich) e 10% di FBS (Foetal Bovine Serum, Gibco). Le cellule sono state incubate per 5 giorni a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>; è stato, quindi, aggiunto 1 $\mu\text{Ci}$ /pozzetto di timidina triziata (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e, dopo 18 ore di incubazione, è stata valutata la radioattività dei vari campioni al gamma-Counter (Top Count, Wallac LKB). Tale strumento a scintillazione liquida permette di misurare, in colpi per minuto (cpm), la proliferazione cellulare sulla base dell'incorporazione della timidina radioattiva. Ogni campione è stato saggiato in triplicato. I pozzetti di controllo contenevano cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sole, cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sole, cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e PBMNCs,

cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e PBMNCs. La percentuale di inibizione della proliferazione linfocitaria è stata calcolata secondo la seguente formula:  $1 - (\text{cpm della cocoltura} / \text{cpm dei soli responder}) \times 100$ . Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con l'ausilio del test T-Student.

I sovranatanti della MLR sono stati, inoltre, raccolti immediatamente prima di aggiungere la timidina triziata e testati, in diluizioni seriali ed in duplicato, per valutare la produzione di Interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mediante l'impiego di un kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### *Valutazione della capacità dei Tregs di inibire la maturazione delle mo-DCs*

Mo-DCs immature ottenute a partire da buffy coats sono state messe in coltura da sole e con cellule T allogene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di pazienti o controlli (rapporto 1:1) per 2 giorni in presenza di LPS (1 ng/ $\mu$ L) in medium RPMI completo, allo scopo di indurre la maturazione delle mo-DCs. Sono state messe in coltura anche mo-DCs in presenza di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> allogene di pazienti o soggetti sani come controllo. Tutte le condizioni sono state fatte in triplicato. Le cellule sono state, quindi, marcate con anticorpi monoclonali anti-CD86 FITC, anti-CD80 PE, anti-CD83 FITC, anti-CD40 FITC, anti-HLA-DR PE (BD Biosciences) per valutare l'inibizione della maturazione delle mo-DCs. Inoltre, i sovranatanti delle coculture sono stati raccolti e testati, in diluizioni seriali ed in duplicato, per valutare la produzione di IL-6 ed IL-10 mediante l'impiego di un kit ELISA (R&D Systems).

#### *Caratterizzazione e quantificazione di linfociti Th17*

La caratterizzazione immunofenotipica dei Th17 è stata effettuata, in accordo con Cosmi et al., utilizzando il seguente pannello di anticorpi: anti-CD4 PerCP, anti-CD161 FITC, anti-CD196 PE (Becton Dickinson).

E' stata, quindi, valutata al citofluorimetro la frequenza delle cellule Th17 circolanti, identificate come CD161<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup> nella sottopopolazione dei linfociti

T CD4<sup>+</sup>. I risultati sono espressi sia come numero assoluto che come percentuale di cellule positive.

### *Analisi statistica*

I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD).

Dove indicato, le differenze sono confrontate usando il test non parametrico di Wilcoxon. Per l'analisi della correlazione è stato utilizzato il test di Spearman.

Pvalues <0.05 sono considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

### *Frequenza ridotta dei Tregs circolanti nei pazienti con PTI*

In questa tesi ho valutato il numero dei Tregs circolanti in 20 pazienti ed in 20 soggetti sani identificandoli come:

- cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>
- cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/negative</sup>

Come mostrato in figura 1A, il numero assoluto delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> dei pazienti (5.5±4.3 cellule/μL) era significativamente ridotto (p<0.01) rispetto ai controlli normali (11.6±7.0 cellule/μL).

A conferma di tale dato, anche il numero assoluto delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/negative</sup> è risultato significativamente (p<0.02) ridotto nei pazienti (51.0±27.3 cellule/μL) rispetto ai soggetti sani (80.5±37.7 cellule/μL) (figura 1B). Inoltre, nei pazienti con PTI c'è una correlazione positiva tra il numero di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> ed il numero delle piastrine (r 0.4; p<0.02).

Per confermare le proprietà regolatorie dei Tregs e valutare se l'espressione di Foxp3 è collegata o meno all'attivazione di cellule T, è stata testata l'espressione di CD69 (marker di attivazione precoce) e HLA-DR (marker di attivazione tardiva) sulle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. L'espressione di entrambi i marcatori è risultata simile tra pazienti e controlli (dato non mostrato). Inoltre, l'analisi dell'espressione di altri marcatori, quali GITR, CTLA-4, CD45RA, CD45RO, sulle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> non ha evidenziato differenze significative tra pazienti e controlli (dato non mostrato).

Questi dati, quindi, confermano che il numero dei Tregs circolanti è ridotto nei pazienti con PTI e dimostrano che non c'è un aumento di cellule T attivate nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

### ***Generazione in vitro di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>***

Per capire se nella PTI il numero ridotto di Tregs circolanti è dovuto ad un difetto nella loro generazione, sono stati effettuati degli esperimenti per caratterizzare la conversione *in vitro* di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> purificate in cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> in seguito a stimolazione con mo-DCs mature. La figura 2A mostra l'analisi citofluorimetrica utilizzata per identificare le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> generate *in vitro*. In seguito a cocoltura di mo-DCs di soggetti sani (8 casi) o di pazienti con PTI (8 casi) con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologhe, la generazione di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> è risultata significativamente ridotta nei pazienti con PTI (54.4±4.5%) rispetto alla controparte normale (88.3±5.8%; p<0.01) (figura 2B).

Questi risultati mostrano che le mo-DCs dei pazienti con PTI hanno una difettiva capacità di generare Tregs *in vitro*.

### ***Valutazione dell'espressione e dell'attività di IDO nelle mo-DCs mature***

Per capire se nella PTI la ridotta capacità delle DCs di generare *in vitro* Tregs è dovuta alla ridotta espressione/up-regolazione di IDO nelle mo-DCs mature, abbiamo innanzitutto quantificato l'espressione dell'mRNA di IDO nelle DCs immature e mature di 8 pazienti e di 10 controlli. Come atteso, l'espressione di IDO è risultata significativamente (p<0.001) elevata nelle mo-DCs mature rispetto a quelle immature, sia nei pazienti che nei controlli (dato non mostrato). Inoltre, l'espressione dell'mRNA di IDO nelle mo-DCs immature non è risultata significativamente diversa tra pazienti e controlli (3.641±3724 vs 4.180±3.731 (numero di copie di *IDO*/numero di copie di *ABL1*)\*10.000; p=NS; dato non mostrato). Al contrario, come mostrato nella figura 3A, il numero assoluto di trascritti di IDO nelle mo-DCs mature dei pazienti è risultato significativamente ridotto rispetto alla controparte normale (972.939±770.724 vs 2.409.367±1.591.788 (numero di copie di *IDO*/numero di copie di *ABL1*)\*10.000; p<0.04). A conferma di questo risultato, valutando i livelli di

chinurenine come indice di attività enzimatica di IDO, abbiamo riscontrato che la concentrazione di chinurenine nei surnatanti delle coculture era significativamente ( $p < 0.05$ ) ridotta nei pazienti ( $40.7 \pm 12.5 \mu\text{M}$ ; 8 casi) rispetto ai soggetti sani ( $66.5 \pm 9.4 \mu\text{M}$ ; 10 casi) (Figura 3B).

Abbiamo quindi valutato se le mo-DCs mature dei pazienti convertono le cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  in cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$  attraverso un meccanismo IDO-dipendente allo stesso modo della controparte normale. La figura 3C dimostra che l'aggiunta dell'inibitore L-1MT alle coculture di cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  con le mo-DCs mature inibisce, allo stesso modo, la generazione di cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$  sia nei pazienti ( $68 \pm 9\%$ ; 6 casi) che nei controlli ( $60 \pm 14\%$ ; 6 casi).

Questi risultati dimostrano, quindi, che nei pazienti con PTI le mo-DCs mature convertono le cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  in cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$  attraverso un meccanismo IDO-dipendente e che la ridotta capacità delle mo-DCs di pazienti con PTI di generare *in vitro* Tregs è correlata alla ridotta espressione e attività dell'enzima IDO nelle mo-DCs mature.

### ***Valutazione dell'attività soppressoria dei Tregs***

Per caratterizzare le cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ , abbiamo innanzitutto valutato la loro attività soppressoria in 8 pazienti e in 8 controlli sani. Cellule mononucleate allogene sono state messe in cocoltura con cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  in assenza o presenza di cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  autologhe, a diversi rapporti.

Come mostrato in figura 4A, l'attività proliferativa delle cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  di soggetti normali in cocoltura con cellule  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  autologhe è inibita per l' $82.7 \pm 24.8\%$  nel rapporto 10:1 e questa capacità soppressoria è ridotta ulteriormente con l'incremento delle cellule "responder":  $73.0 \pm 21.0\%$  per il rapporto 20:1,  $53.0 \pm 21.8\%$  per il rapporto 40:1 e  $56.7 \pm 17.0\%$  per il rapporto 100:1. Al contrario, le cellule T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  dei pazienti con PTI mostrano una funzione soppressoria significativamente inferiore ( $p < 0.05$ ) rispetto ai soggetti

normali: in particolare, la capacità di inibire la proliferazione di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologhe è del 39.0±15.0% per il rapporto 40:1 e del 18.7±16.5% per il rapporto 100:1.

A supporto di questi dati, il dosaggio di IFN- $\gamma$  nei sovranatanti delle coculture dell'MLR ha mostrato che la percentuale di inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  era ridotta in maniera significativa (16.2±12.5%; p<0.05), quando le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti con PTI erano messe in cocoltura al rapporto 100:1 *responder-suppressor* rispetto ai soggetti sani (38.8±11.2%) (figura 4B).

Si può, quindi, affermare che l'attività soppressoria dei Tregs risulta comparabile fra pazienti e controlli quando il rapporto linfociti T-regolatori/linfociti T-*responder* è basso; al contrario, a rapporti elevati, la capacità di inibizione della proliferazione di cellule T-effettrici risulta ridotta in maniera significativa nei Tregs dei pazienti con PTI.

#### ***Capacità dei Tregs di inibire la maturazione delle mo-DCs***

Allo scopo di valutare eventuali differenze nella capacità di inibire la maturazione delle Dcs da parte dei Tregs, mo-DCs immature normali sono state messe in cocoltura con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> allogene di 6 pazienti con PTI e di 6 controlli per 2 giorni, dopo aver aggiunto LPS come stimolo maturativo. L'espressione del CD80 e del CD86 è stata valutata come Ratio fra il MIF (Mean Intensity Fluorescence) del CD80/CD86 nelle mo-DCs + le cellule T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) ed il MIF delle DCs da sole.

Quando le mo-DCs sono state coltivate con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> normali, l'espressione delle molecole co-stimolatorie CD86 (figura 5A) e CD80 (figura 5B) era significativamente ridotta (p<0.05) rispetto alle mo-DCs coltivate in presenza di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

Al contrario, mo-DCs coltivate con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di pazienti con PTI non mostravano nessuna variazione significativa nell'espressione del CD80 e del CD86 rispetto alla cocoltura con le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (figura 5A-B).

Quindi, le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti hanno una minore capacità di inibire la maturazione delle mo-DCs rispetto a quelle di individui sani.

Per valutare se il contatto con differenti sottopopolazioni di cellule T induceva differenze funzionali nelle DCs di pazienti e controlli, abbiamo quantificato la produzione di citochine nelle coculture. In particolare, la concentrazione di varie citochine è stata valutata nel surnatante delle mo-DCs normali immature coltivate per due giorni con cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> di pazienti con PTI (6 casi) o di controlli sani (6 casi). La figura 6A mostra che la concentrazione di IL-10 era significativamente ridotta ( $p < 0.01$ ) nel surnatante delle mo-DCs maturate in presenza di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di pazienti con PTI ( $99 \pm 26$  pg/mL) rispetto alla controparte normale ( $218 \pm 19$  pg/mL). Inoltre, rispetto alle mo-DCs coltivate con le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei soggetti sani, la concentrazione di IL-10 è risultata ridotta nella cocoltura delle mo-DCs con le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, sia dei pazienti che dei controlli. Al contrario, non è emersa nessuna differenza tra le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, sia dei pazienti che dei controlli, riguardo alla concentrazione di IL-12 (dato non mostrato). La concentrazione di IL-6, invece, ha mostrato un *pattern* simile a quello dell'IL-10 (figura 6B), con una concentrazione significativamente inferiore ( $p < 0.01$ ) nel surnatante della cocoltura delle mo-DCs con le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti ( $690 \pm 145$  pg/mL) rispetto alla controparte normale ( $1.119 \pm 112$  pg/mL).

Questi risultati indicano, quindi, che nella PTI le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hanno un deficit funzionale, in quanto non sono in grado di inibire la maturazione delle DCs normali e promuovono la formazione di DCs con maggiori capacità immunogeniche. Inoltre, le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di questi pazienti mostrano una ridotta capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T rispetto alla controparte normale.

### *Quantificazione dei linfociti Th17*

L'analisi citofluorimetrica dimostra che il numero assoluto dei linfociti Th17 circolanti non risulta significativamente differente tra pazienti e controlli (rispettivamente  $107 \pm 72$  vs  $93 \pm 39$  cellule/ $\mu$ l;  $p=NS$ ) (figura 7A). Come mostrato in figura 7B, anche la percentuale di cellule CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup> è simile tra pazienti ( $12.22 \pm 4.82\%$ ) e controlli ( $11.88 \pm 4.95\%$ ) ( $p=NS$ ). Inoltre, non è stata riscontrata alcuna correlazione significativa tra il numero dei linfociti Th17 circolanti ed il numero di piastrine.

Questi risultati, quindi, mostrano che il numero dei Th17 circolanti nei pazienti con PTI non differisce rispetto ai soggetti sani.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I Tregs giocano un ruolo importante nella regolazione della tolleranza al *self*. Il loro compito principale è quello di controllare ed inibire l'attività dei linfociti T autoreattivi che si trovano in circolo. Ne consegue che alterazioni del numero e della funzione di tali cellule giocano un ruolo chiave nella genesi dell'autoimmunità. La PTI è un disordine autoimmune, in cui alterazioni quanti-qualitative dei Tregs sono state descritte da vari Autori (Sakakura, 2007; Liu, 2007; Ling, 2007; Stasi, 2008; Yu, 2008). L'interazione bidirezionale tra le DCs e Tregs, invece, non è mai stata analizzata.

I risultati presentati in questa tesi dimostrano che nei pazienti con PTI il numero ridotto dei Tregs circolanti può essere dovuto alla ridotta capacità delle DCs di convertire le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in Tregs. Tale dato è correlato alla ridotta espressione ed attività dell'enzima IDO nelle mo-DCs mature dei pazienti, in quanto DCs che esprimono IDO favoriscono la formazione dei Tregs. A loro volta, i Tregs dei pazienti con PTI mostrano una minore capacità di inibire la maturazione delle DCs e di sopprimere la proliferazione delle cellule T. Tale condizione risulta associata ad un alterato *pattern* di secrezione di citochine rispetto ai controlli.

I Tregs circolanti sono stati identificati come cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/negative</sup>. I risultati hanno mostrato che la frequenza di questa sottopopolazione linfocitaria nei pazienti con PTI è ridotta rispetto ai soggetti sani, in accordo con altri Autori (Stasi, 2008; Sakakura, 2007), e che il loro numero è correlato al numero di piastrine e, quindi, alla severità della malattia. Sulla base di tali risultati ci siamo chiesti se la riduzione del numero dei Tregs potesse essere dovuta ad una ridotta capacità delle DCs dei pazienti con PTI di convertire *in vitro* cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in Tregs. I dati dimostrano che le mo-DCs mature dei pazienti con PTI sono meno efficienti nella conversione e generazione di Tregs rispetto alla controparte normale. Tale

risultato è correlato alla ridotta espressione/attività di IDO nelle mo-DCs di questi pazienti, poiché è stato dimostrato che DCs che esprimono l'enzima IDO favoriscono la generazione di Tregs (Chung, 2009). Resta comunque da chiarire se questa alterata conversione riscontrata *in vitro* rispecchi effettivamente un'alterata generazione di Tregs *in vivo*. I risultati ottenuti suggeriscono comunque che nella PTI questo *pathway* è alterato e può giocare un ruolo patogenetico.

Catani et al. hanno recentemente dimostrato che, nei pazienti con PTI, le mo-DCs pre-stimolate con piastrine autologhe/allogene, fresche e invecchiate, sono più efficienti nella stimolazione della proliferazione delle cellule T-effettrici autologhe rispetto alle mo-DCs di individui sani. Abbiamo, quindi, cercato di chiarire perché le mo-DCs dei pazienti con PTI mostrano un fenotipo più maturo e se ciò può avere un valore patogenetico.

I risultati di questa tesi dimostrano che nei pazienti con PTI il fenotipo più maturo delle DCs può essere dovuto alla ridotta capacità dei Tregs di controllare/inibire la maturazione delle DCs stesse. Questo dato è stato, inoltre, confermato dalla ridotta secrezione di citochine, in particolare IL-10 e IL-6, nel surnatante delle coculture mo-DCs/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Infatti, come noto, l'IL-10 è una citochina in grado di sopprimere il rilascio di citochine pro-infiammatorie e inibire la capacità di presentare gli antigeni nelle APCs. L'IL-6 è una citochina pleiotropica e recentemente è stata dimostrata la sua capacità di inibire la maturazione delle DCs, in quanto la maturazione di tali cellule (derivate *in vitro* a partire da cellule CD34<sup>+</sup>) è risultata inibita in presenza di questo fattore (Ratta, 2002).

Inoltre, alla luce del fatto che il CTLA-4 dei Tregs gioca un ruolo fondamentale nell'inibizione della maturazione delle DCs e che nel nostro studio l'espressione di questa molecola nei Tregs circolanti non è risultata differente tra pazienti e controlli, si può escludere l'ipotesi secondo cui nella PTI

alterazioni dell'espressione del CTLA-4 possano influenzare la maturazione delle DCs.

I nostri dati, inoltre, sono in accordo con il gruppo di Zhang XL et al. che ha dimostrato che, nella PTI, Tregs possono essere generati de novo a partire da cellule T non regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> e che le DCs modulate con questi Tregs mostrano un fenotipo semi-maturo (Zhang XL, 2009).

In conclusione, questi dati dimostrano che nella PTI l'interazione bidirezionale tra Tregs e DCs risulta alterata e svolge un ruolo nella patogenesi di questa malattia, in quanto, da un lato, si hanno dei Tregs con un deficit numerico e funzionale e, dall'altro, delle DCs con una maggiore capacità immunogenica.

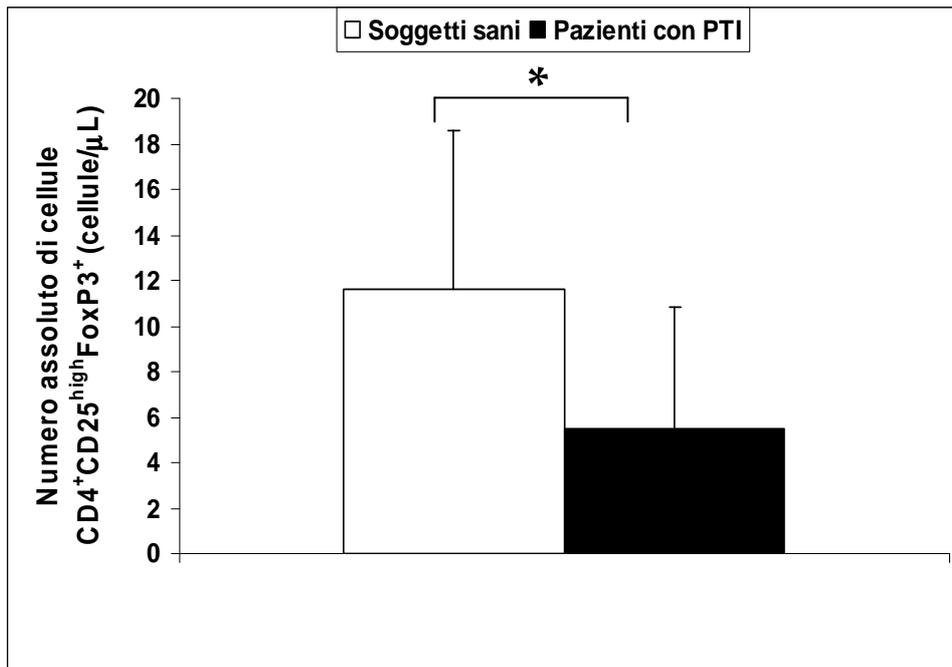
Un ambito innovativo nello studio dei meccanismi patogenetici della PTI riguarda il rapporto tra Tregs e Th17. Come è noto, TGF- $\beta$  ed IL-2 stimolano la produzione dei Tregs, ma allo stesso tempo hanno un ruolo antinfiammatorio e di inibizione della proliferazione di linfociti Th17, mentre l'IL-6 e l'IL-21 stimolano la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti Th17 ma inibiscono l'attività T-regolatoria (Veldhoen, 2006; Marie, 2006; Korn, 2007; Mucida, 2007; Awasthi, 2008; Zhou, 2008). Poichè la frequenza dei Tregs risulta alterata in questi pazienti e, vista la stretta relazione tra Tregs e Th17, abbiamo ipotizzato che anche la frequenza di questi ultimi potesse essere alterata nei pazienti rispetto ai soggetti sani. I risultati ottenuti dimostrano invece che il numero assoluto e la percentuale dei linfociti Th17 sono simili tra pazienti e controlli sani; inoltre, in accordo con Guo et al., non è risultata alcuna correlazione tra i linfociti Th17 e il numero di piastrine in questi pazienti (Guo, 2009).

Studi precedenti hanno dimostrato che i livelli plasmatici di IL-17 erano simili tra pazienti con PTI e controlli (Zhu, 2010; Ma, 2008). Poiché le citochine Th1 sopprimono la formazione dei Th17 (Harrington, 2005), questi risultati possono essere spiegati, almeno in parte, dall'elevata risposta di tipo Th1 riscontrata già in passato nei pazienti con PTI (Semple, 2010).

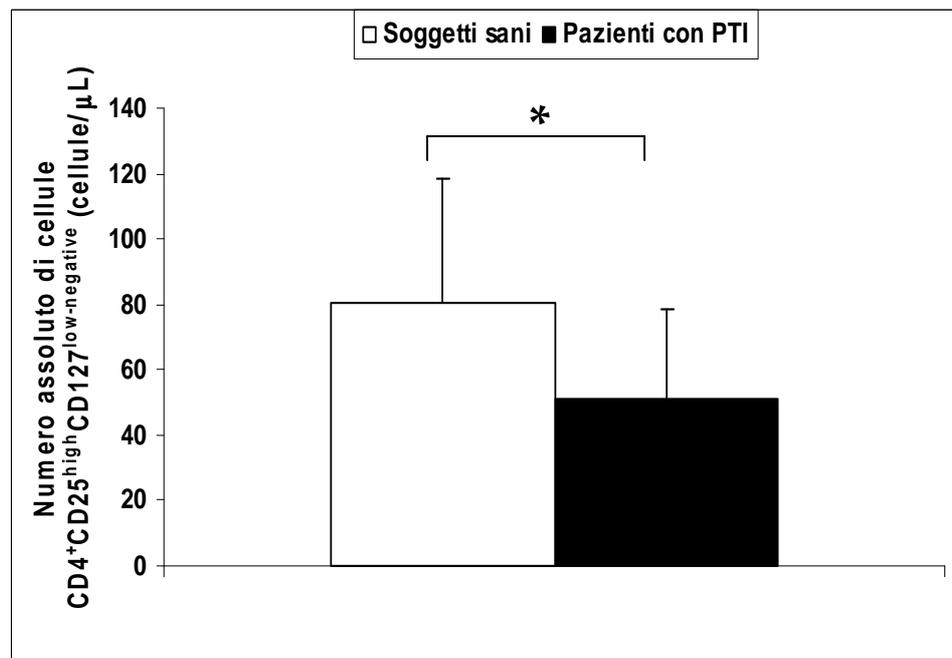
In conclusione, questi risultati dimostrano che nella PTI, a differenza di altre malattie autoimmuni, il numero dei linfociti Th17 circolanti non differisce dalla controparte normale.

## FIGURE

**Figura 1:** Ridotto numero dei Tregs nei pazienti con PTI rispetto ai soggetti sani. I Tregs circolanti sono stati identificati come numero di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> (A) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>127<sup>low/negative</sup> (B). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. (\*p<0.02)

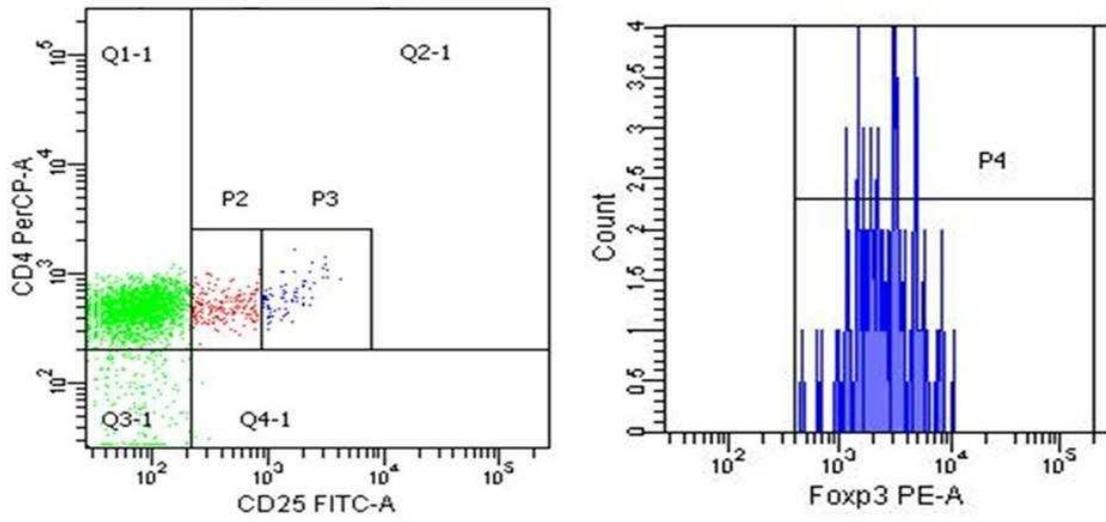


**A**

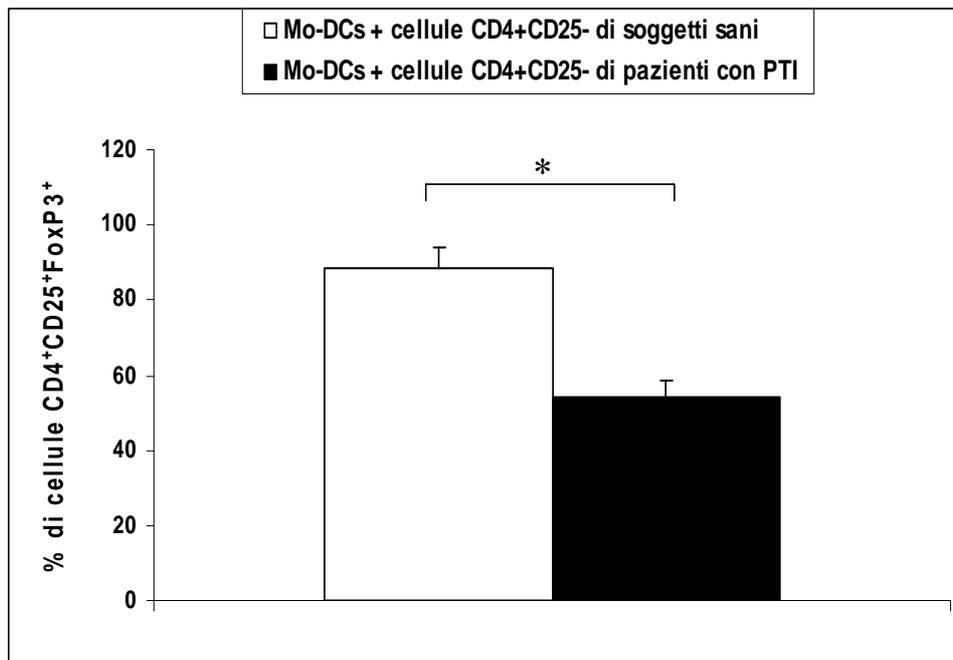


**B**

**Figura 2:** Conversione *in vitro* delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> da parte delle mo-DCs mature. (A) Esempio di identificazione tramite citofluorimetria di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> generate *in vitro*. Il gate P3 identifica le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. Il gate P4 mostra le cellule Foxp3 positive nella frazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. (B) Percentuale di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> generate *in vitro*. I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. (\*p<0.01)

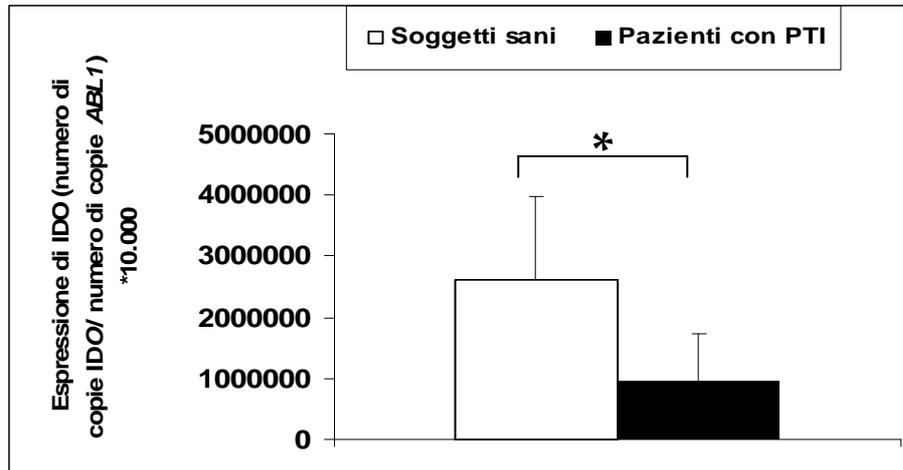


A

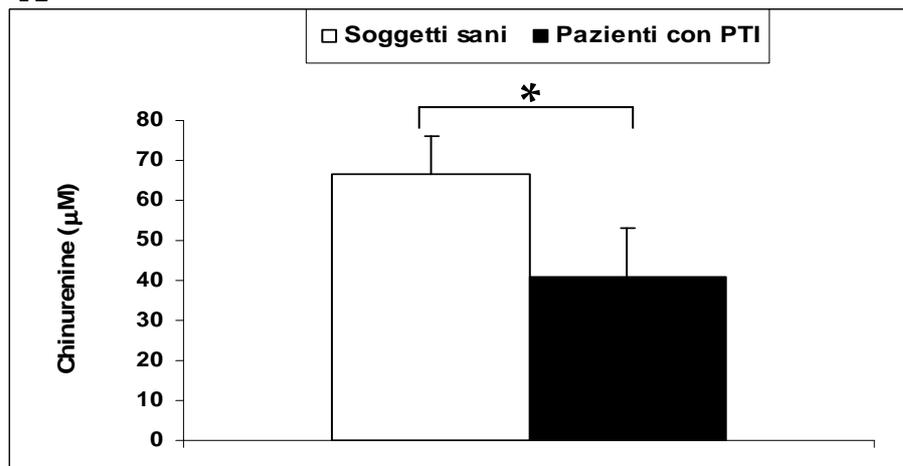


B

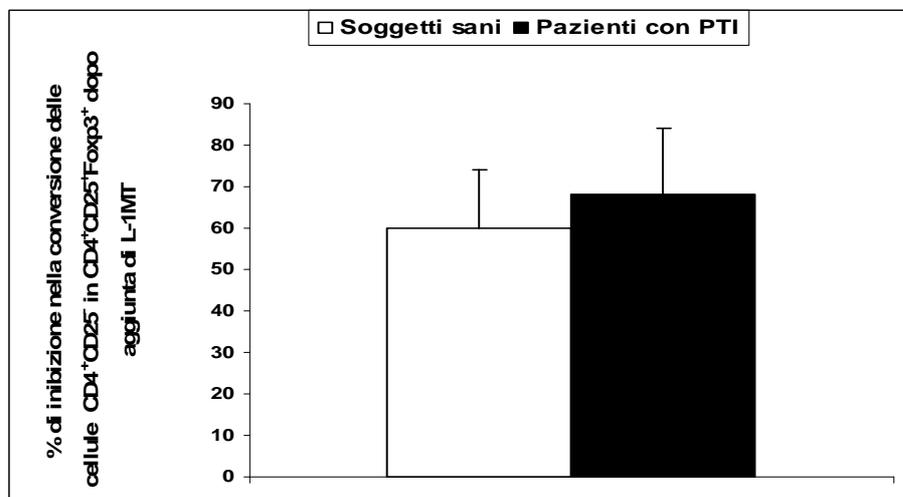
**Figura 3:** Ridotta espressione e attività di IDO nelle mo-DCs dei pazienti con PTI. (A) Real-time RT-PCR di *IDO*. (B) Livelli di chinurenine, valutati mediante saggio spettrofotometrico, nel surnatante delle mo-DCs mature risospese in terreno arricchito di triptofano, come indice di attività enzimatica di IDO. (C) Percentuale di inibizione della conversione di cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> in cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> in seguito a trattamento con l'inibitore specifico di IDO (L-1MT). I risultati sono espressi come media ± deviazione standard. (\*p<0.05)



A

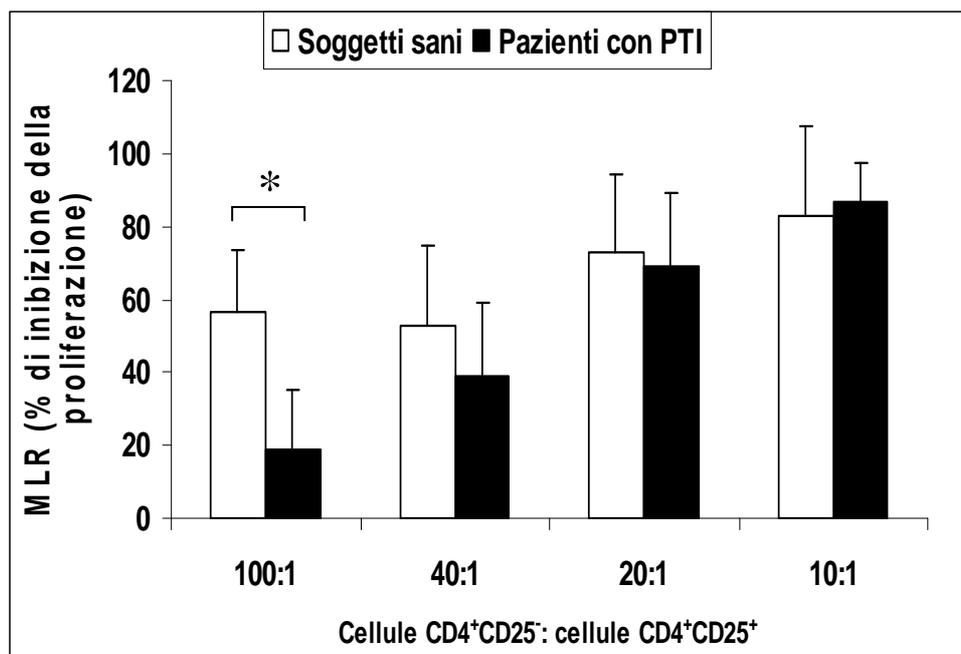


B

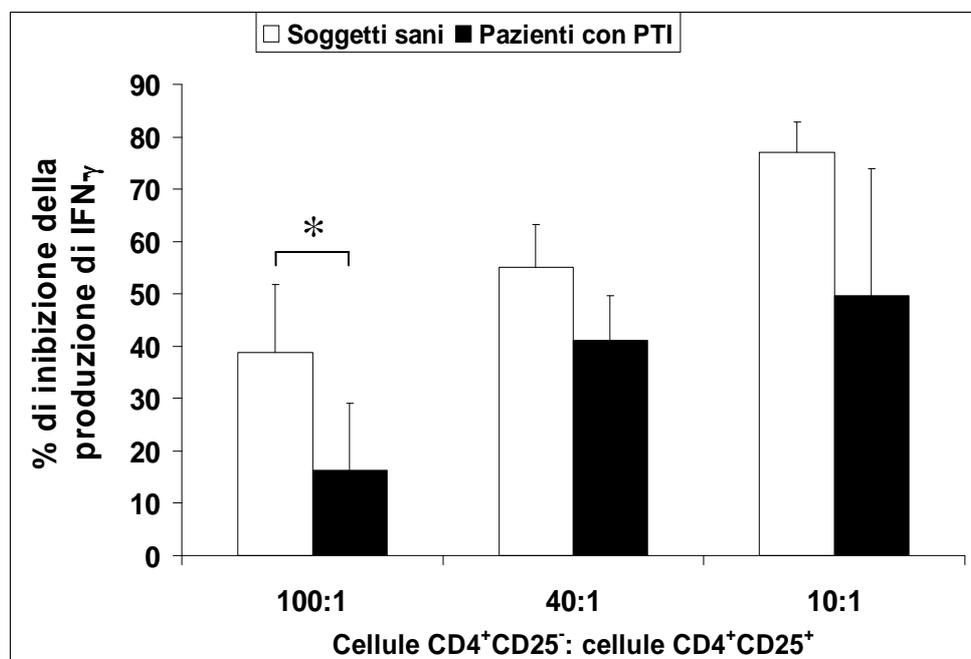


C

**Figura 4:** Ridotta capacità soppressiva delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti con PTI. (A) MLR allogena. Inibizione della proliferazione di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ad opera di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> di pazienti con PTI o controlli, a diversi rapporti, in presenza di PBMCs allogene. (B) Valutazione della percentuale di inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  nei sovranatanti delle colture per MLR. I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. (\*p<0.05)

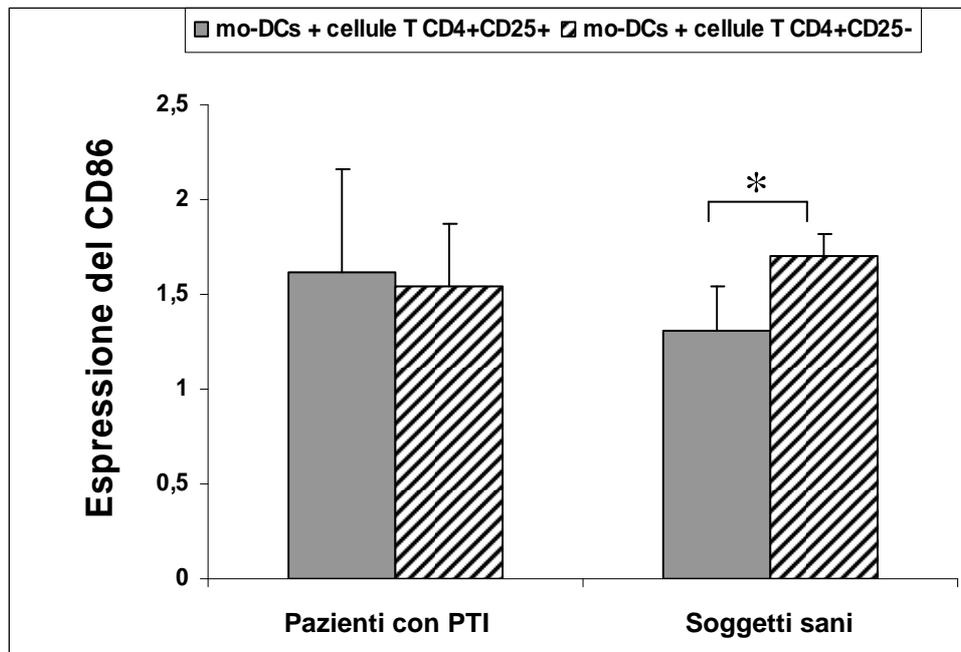


A

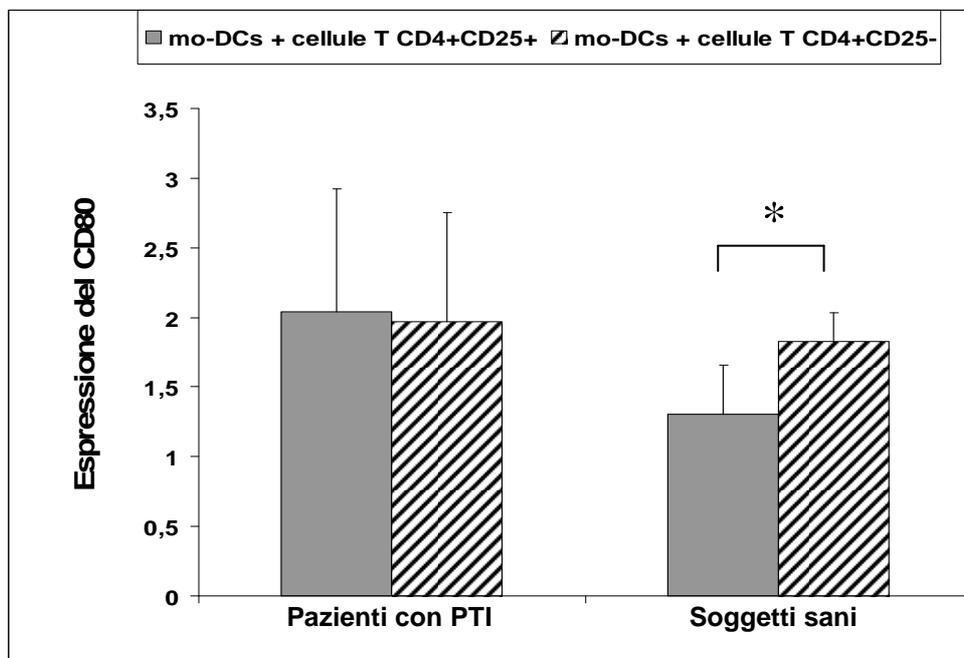


B

**Figura 5:** Ridotta capacità delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dei pazienti con PTI di inibire la maturazione delle mo-DCs. (A) Espressione del CD86 e (B) espressione del CD80, entrambi presentati come rapporto tra il MIF delle mo-DCs più le cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/-</sup> e il MIF delle mo-DCs. I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. (\*p<0.05)

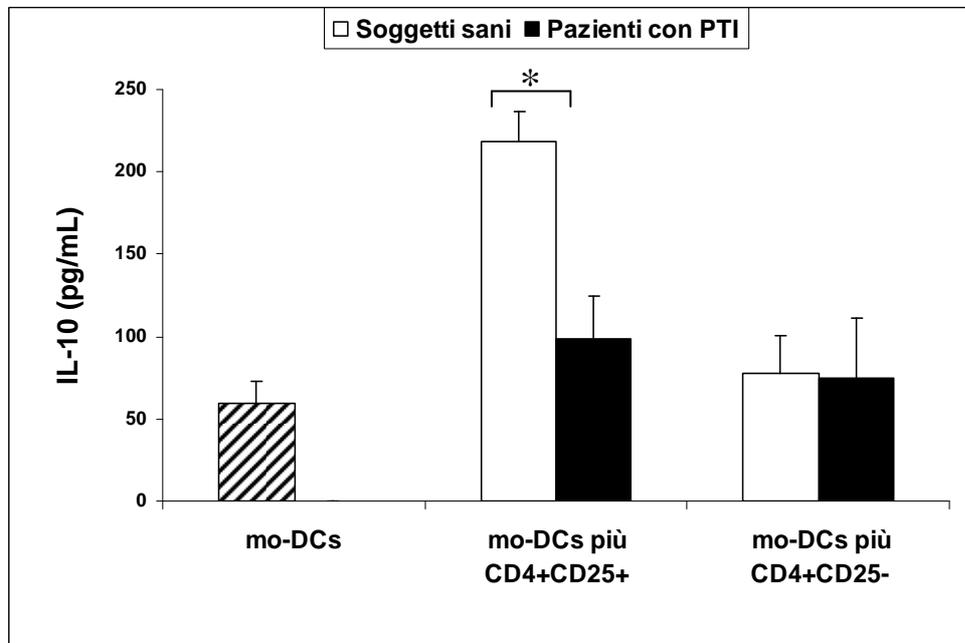


A

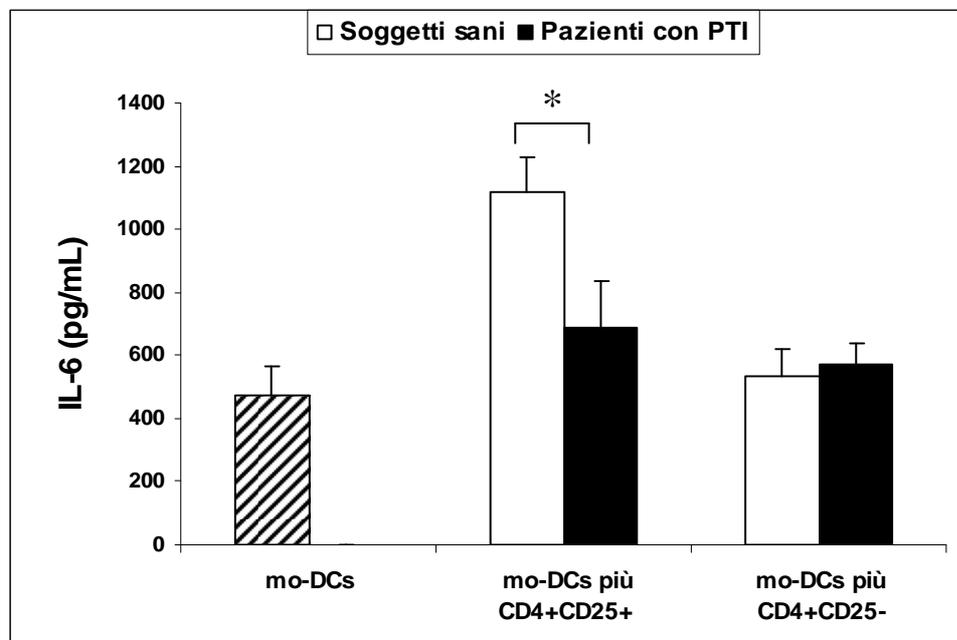


B

**Figura 6:** Analisi delle citochine nel surnatante delle coculture di mo-DCs con cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/-</sup> tramite dosaggio ELISA. Valutazione della produzione di IL-10 (A) e IL-6 (B). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. (\*p<0.01)

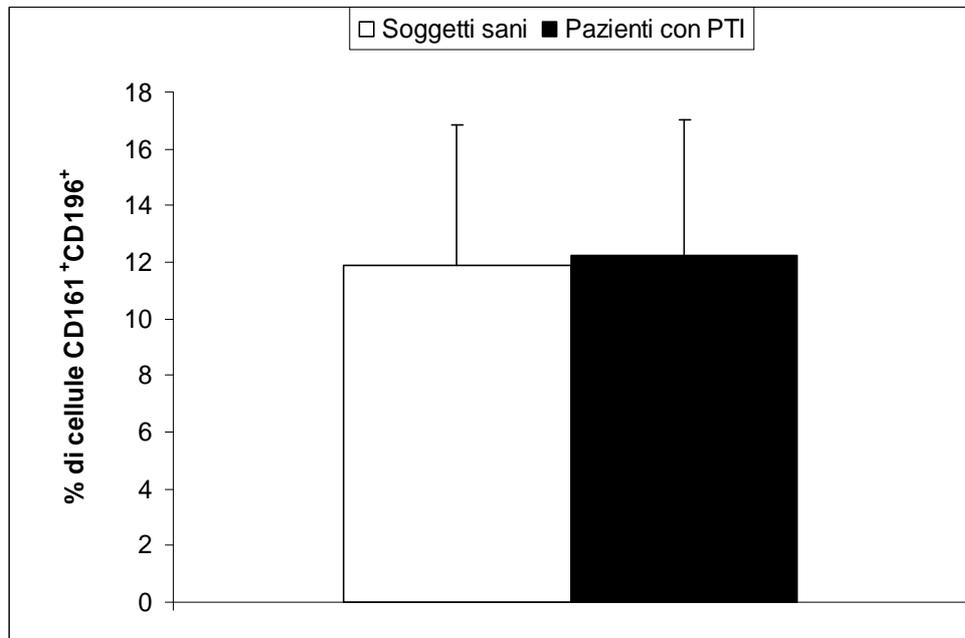


**A**

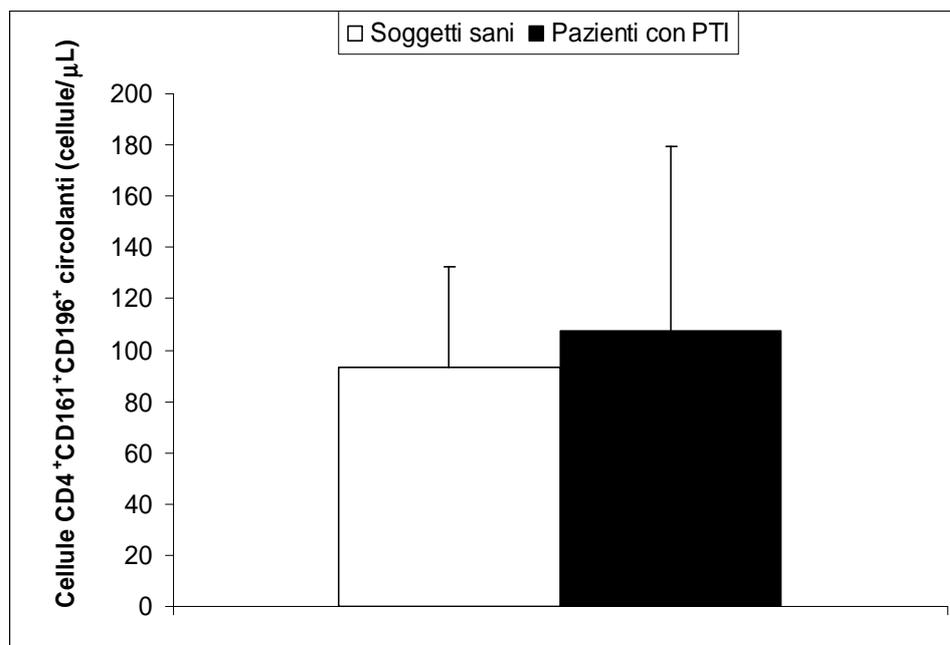


**B**

**Figura 7:** Analisi citofluorimetrica dei linfociti circolanti Th17 nei pazienti con PTI e nei controlli. I linfociti Th17 sono stati identificati come cellule CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD196<sup>+</sup> e sono mostrati (A) come percentuale di cellule CD4<sup>+</sup> o (B) numero assoluto. I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.



**A**



**B**

## **BIBLIOGRAFIA**

Abbas, Lichtman, Pober. *Immunologia cellulare e molecolare*, 4° ed., 218-241, Piccin, 2000.

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148(1):32-46.

Albert ML, Pearce SFA, Francisco ML et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphabeta5 and CD36, and cross present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1998; 188:1359-1368.

Andersson PO, Stockelberg D, Jacobsson S et al. A transforming growth factor-beta1-mediated bystander immune suppression could be associated with remission of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 2000; 79(9):507-13.

André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S et al. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2009; 174(5):1575-87.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F et al. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*, 2008; 20(11):1361-8.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 2007; 204(8):1849-61.

Awasthi A, Murugaiyan G, Kuchroo VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *J Clin Immunol*, 2008; 28(6):660-70.

Baecher Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001; 167:1245-53

Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med*, 2004; 200(3):273-6.

Balandina A, Lécart S, Darteville P et al. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*, 2005; 105(2):735-41.

Ballem PJ, Segal JM, Stratton JR et al. Mechanisms of Thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest*, 1987; 80:33-40.

- Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:767-811.
- Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2006;27(12):541-4.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441(7090):235-8.
- Blomberg S, Eloranta ML, Magnusson M et al. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2524-32.
- Bopp T, Becker C, Klein M et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007; 204(6):1303-10.
- Boshkov LK, Kelton JG, Halloran PF. HLA-DR expression by platelets in acute Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol*, 1992; 81(4):552-557.
- Bouchonnet F, Lecossier D, Bellocq A et al. Activation of T cells by previously activated T cells. HLA-unrestricted alternative pathway that modifies their proliferative potential. *J Immunol*, 1994; 153(5):1921-35.
- Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA et al. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*, 2001; 2(12):1126-32.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in Systemic Lupus Erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 1994; 179:1317-1330.
- Catani L, Fagioli ME, Tazzari PL et al. Dendritic cells of Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol*, 2006; 34:879-887.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C et al. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;87(6):2376-85.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp. Med.* 1996;184(2):747-52.
- Chang M, Nakagawa PA, Williams SA et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal antibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, 2003; 102:887-895.

Chung DJ, Rossi M, Romano E et al. Indoleamine 2,3 dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*. 2009; 114:555-63

Cines DB, Blanchette VS. Immune Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 2002; 346:995-1008.

Cines DB, McMillan R. Management of adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med*, 2005;56:425-42.

Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. *Current Opinion in Hematology*, 2007; 14:511-514.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450:566-569.

Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008;205:1903-16.

Crispin JC, Martínez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, 2003; 21(3):273-6.

Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ et al. Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity*, 1996; 24(2):81-100.

Curti A, Pandolfi S, Valzasina B et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood*, 2007;109(7):2871-7.

Del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R. Development and functional specialization of CD103(+) dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010;234(1):268-81.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000;165(11):6037-46.

Eddahri F, Oldenhove G, Denanglaire S et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune responses to exogenous antigens. *Eur J Immunol*, 2006; 36(4):855-63.

Egner W, McKenzie JL, Smith SM et al. Human bone marrow contains potent stimulatory cells for the allogeneic MLR with the phenotype of dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1993;329:263-8.

- Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*, 2007; 109(3):1265-74.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, 2004; 200(3):277-85.
- Engering AJ, Cella M, Fluitsma DM et al. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997;417:183-7.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1069-77.
- Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1209-17.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:330-336.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2005; 6(11):1142-51.
- Furuno K, Yuge T, Kusuhara K et al. CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr*, 2004; 145(3):385-90.
- Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E et al. The clinical outcome of autoimmune thrombocytopenic purpura patients is related to their T cell immunodeficiency. *Br J Haematol*, 1993; 84(3):464-70.
- Garín MI, Chu CC, Golshayan D et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007; 109(5):2058-65.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
- Gernsheimer T. Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: mechanisms of pathogenesis. *The Oncologist*, 2009;14(1):12-2.
- Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaber SA. Suppressor T cells. *J Immunol.* 1972;108(3):586-90.
- Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO. *Trend Immunology.* 2003;24(5):242-248.

Guo ZX, Chen ZP, Zheng CL et al. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2009;82(6):488-9.

Hame D.A. et al.: The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. *J. Immunol*, 1988; 141:3405-3409.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell*. 2003;11(3):619-33.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR et al. IL17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-32.

Hart DN, Prickett TC, McKenzie JL et al. Characterization of interstitial dendritic cells in human tissues. *Transplant Proc*. 1989;21(1 Pt 1):401-3.

Hervé M, Isnardi I, Ng YS et al. CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *J Exp Med*, 2007;204(7):1583-93.

Heyns AP, Lotter MG, Badenhorst PN et al. Kinetics and sites of destruction of 111-indium-oxine-labeled platelets in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: a quantitative study. *Am J Hematol*, 1982; 12:167-177.

Ho CS, Munster D, Pyke CM et al. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood*. 2002;99(8):2897-904.

Hönig A, Rieger L, Kapp M et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod. Immunol*. 2004;61(2):79-86.

Houwerzijl Ej, Blom NR, Van Der Want JJJ et al. Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndrome and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death. *Leukemia*, 2006; 20:1937-1942.

Houwerzijl Ej, Blom NR, Van Der Want JJJ et al. Ultrastructural study shows morphological features of apoptosis and paraapoptosis in megakaryocytes from patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*, 2004; 103:500-506.

Huang CT, Workman CJ, Flies D et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21(4) 67.

Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983;80(19):6041-5.

- Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114:1198-1208.
- Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* 1996;289(1):1-8.
- Jürgens B, Hainz U, Fuchs D et al. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood.* 2009;114(15):3235-43.
- Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet*, 1997; 349(9064):1531-6.
- King IL, Segal BM. Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J Immunol*, 2005; 175(2):641-5.
- Korn T, Bettelli E, Gao W et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 2007; 448(7152):484-7.
- Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C et al. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med*, 2004; 199(9):1285-91.
- Kryczek I, Wei S, Zou L et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*, 2006; 177(1):40-4.
- Kukreja A, Cost G, Marker J et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*, 2002; 109(1):131-40.
- Lan RY, Ansari AA, Lian ZX et al. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2005; 4(6):351-63.
- Lauria F, Mantovani V, Catovsky D et al. T gamma cell deficiency in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Scand J Haematol*, 1981; 26(2):156-60.
- Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin. Invest.* 1993;92(6):2587-96.
- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2005; 175(7):4180-3.
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005; 54(1):92-9.

Ling Y, Cao X, Yu Z et al. Circulating dendritic cells subsets and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol*, 2007; 79(4):310-6.

Liu B, Zhao H, Poon MC et al. Abnormality of CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2007; 78(2):139-43.

López JA, Bioley G, Turtle CJ et al. Single step enrichment of blood dendritic cells by positive immunoselection. *J Immunol Methods*. 2003;274(1-2):47-61.

Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gottschalk C et al. Cutting edge: CD25<sup>+</sup> regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J Immunol*, 2008; 181(7):4447-51.

Ma D, Zhu X, Zhao P et al. Profile of Th17 cytokines (IL17, TGF- $\beta$ , IL-6) and Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2008;87(11):899-904.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13):4512-20.

Mahajan D, Wang Y, Qin X et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2006; 17(10):2731-41.

Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol*, 2007; 250(1-2):1-13.

Maloy KJ, Salaun L, Cahill R et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med*, 2003; 197(1):111-9.

Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- $\beta$ 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med*, 2005; 201(7):1061-7.

Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- $\beta$  receptor. *Immunity*, 2006; 25(3):441-54.

McIlroy D, Troadec C, Grassi F et al. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood*. 2001;97(11):3470-7.

- McLellan AD, Starling GC, Williams LA et al. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J Immunol.* 1995;25(12):3525.
- McMillan R, Tani P, Millard F et al. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood*, 1987; 70(4):1040-5.
- McMillan R. The pathogenesis of chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. *Sem Hematol*, 2007; 44(suppl5):S3-S11.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Rev. Immunol.* 2004;4:762-773.
- Mizutani H, Tsubakio T, Tomiyama Y et al. Increased circulating Ia-positive T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol*, 1987; 67(1):191-7.
- Moire RN. Production of lymphocyte-activating factor (interleukin-1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. *J. Immunol*, 1980; 125:1302-1309.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 2003; 73(2):209-12.
- Mucida D, Park Y, Kim G et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007;317(5835):256-60.
- Mudd PA, Teague BN, Farris AD. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, 2006; 64(3):211-8.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189(9):1363-72.
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002;297(5588):1867-70.
- Musso T, Gusella GL, Brooks A et al. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood*. 1994;83(5):1408-11.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 2001; 194(5):629-44.

Nomura S, Yanabu M, Kido H et al. Significance of cytokines and CD68-positive microparticles in immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 1995; 55(1):49-56.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 2007; 448(7152):480-3.

O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004;10:801-805.

Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR et al. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2225-31.

Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev*. 2005; 203:156-164.

O'Doherty U, Peng M, Gezelter S et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994;82(3):487-93.

Olweus J, BitMansour A, Warnke R et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1997;94(23):12551-6.

Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66 Suppl 3:87-90.

Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003; 299(5609):1033-6.

Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. Adhesion molecules on human tonsil dendritic cells. *Transplantation*. 1992;53(2):483-90.

Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*. 1988;46(5):754-61.

Provan D, Stasi R, Newland AC et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115:168-86.

Psaila B, Bussel JB. Immune thrombocytopenic purpura. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007; 21(4):743-759.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin. Immunopathol*. 2005;26(3):273-87.

- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp. Med.* 2002;196(4):517-27.
- Ratta M, Fagnoni F, Curti A, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood.* 2002; 100:230-7.
- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000;192(2):295-302.
- Ren X, Ye F, Jiang Z et al. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12):2076-84.
- Res PC, Couwenberg F, Vyth-Dreese FA, Spits H. Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood.* 1999;94(8):2647-57.
- Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113:2386-93.
- Romagnani S, Maggi E, Liotta F et al. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol.* 2009;47(1):3-7.
- Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* 2010;234(1):120-41.
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C et al. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev,* 2001; 182:68-79.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol.* 1995;155:1151-1164.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101(5):455-8.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al. Regulatory T-cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5):775-787.
- Sakakura M, Wada H, Tawara I et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res,* 2007; 120(2):187-93.

- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp. Med.* 1994;179(4):1109-18.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2:965-975.
- Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1991; 78(10):2619-25.
- Semple JW, Lazarus AH, Freedman J. The cellular immunology associated with autoimmune thrombocytopenic purpura: an update. *Transfus Sci*, 1998; 19(3):245-51.
- Semple JW. Immunobiology of T helper cells and antigen-presenting cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr Suppl*, 1998;424:41-5.
- Semple JW, Provan D, Garvey MB, Freedman J. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Cur Opin Hematol.* 2010;17(6):590-5.
- Semple JW. Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood Rev*, 2002; 16(1):9-12.
- Sharma MD, Baban B, Chandler P et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin. Invest.* 2007;117(9):2570-82.
- Shimomura T, Fujimura K, Takafuta T et al. Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 1996; 95(4):732-7.
- Solanilla A, Pasquet JM, Viallard JF et al. Platelet-associated CD154 in Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood*, 2005; 105(1):215-218.
- Stasi R, Cooper N, Del Poeta G et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*, 2008; 112(4):1147-50.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:685-711.
- Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005; 174(1):164-73.

- Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am. J Pathol.* 2001;159(1):285-95.
- Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol*, 2005; 66(3):222-30.
- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 2006; 203(3):505-11.
- Takikawa O. Biochemical and medical aspect of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated Ltryptophan metabolism. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 2005;338(1):12-19.
- Tang Q, Adams JY, Tooley AJ et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006; 7(1):83-92.
- Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3 regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008; 9:239-244.
- Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 1991;5(11)2516-22.
- Terness P, Bauer TM, Röse L et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp. Med.* 2002;196(4):447-57.
- Terness P, Chuang JJ, Bauer T et al. Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood.* 2005;105(6):2480-6.
- Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.* 1999;4(5):199-220.
- Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA et al. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004; 172(11):6519-23.:503-13.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(49):19446-51.
- Trent R, Adams E, Erhardt C et al. Alterations in T gamma cells in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Immunol*, 1981; 127(2):621-6.
- Tura S. Corso di malattie del sangue e degli organi ematopoietici. *Società Editrice Esculapio*, 1998.

Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, 2006; 108(1):253-61.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C et al. Langerin, a novel Ctype lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000;12(1):71-81.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006; 24(2):179-89.

Venet F, Pachot A, Debard AL et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*, 2006; 177(9):6540-7.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 2004; 199:971-979.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7):523-32.

Vuckovic S, Kim M, Khalil D et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases CD123hi blood dendritic cells with altered CD62L and CCR7 expression. *Blood*. 2003;101(6):2314-7.

Wan S, Xia C, Morel L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions. *J Immunol*, 2007; 178(1):271-9.

Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K et al. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2007; 81(3):663-71.

Williams KA, Hart DN, Fabre JW, Morris PJ. Distribution and quantitation of HLA-ABC and DR (Ia) antigens on human kidney and other tissues. *Transplantation*. 1980;29(4):274-79.

Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*. 2005; 174(2):688-95.

Yasui H, Takai K, Yoshida R, Hayaishi O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986;83(17):6622-6.

Yu J, Heck S, Patel V et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2008;112(4):1325-8.

Zarek PE, Huang CT, Lutz ER et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008; 111(1):251-9.

Zeigler ZR, Rosenfeld CS, Nemunaitis JJ et al. Increased macrophage colony-stimulating factor levels in immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1993; 81(5):1251-4.

Zhang J, Ma D, Zhu X et al. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2009;94(9):1326-9.

Zhang XL, Peng J, Sun JZ et al. De novo induction of platelet-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from CD4+CD25- cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2009; 113:2568-77.

Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ et al. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006; 107(10):3925-32.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 2007; 8(9):967-74.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008; 453(7192):236-40.

Zhu X, Ma D, Zhang J et al. Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol*. 2010;30(2):253-9.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-92.