



**UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

**XXVIII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN**

**SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO**

**- INDIRIZZO CLINICO EPIDEMIOLOGICO-**

**NUOVI MODELLI PER LO STUDIO  
DELL'AZIONE DI FARMACI ANTI-  
REUMATICI SUI LINFOCITI REGOLATORI**

Settore scientifico-disciplinare: **MED/38\_Pediatria Generale e Specialistica**

**DOTTORANDA**

**VANESSA CANDILERA**

**COORDINATORE**

**PROF.SSA GIULIANA DECORTI**

**SUPERVISORE DI TESI**

**DOTT. ALBERTO TOMMASINI**

**ANNO ACCADEMICO 2014 / 2015**

## RIASSUNTO

Le malattie reumatiche sono delle malattie infiammatorie autoimmuni croniche che colpiscono prevalentemente le donne e di cui non si conosce la causa scatenante. In particolare l'artrite reumatoide è una malattia ad evoluzione invalidante che riduce la qualità della vita di chi ne soffre. Questa patologia colpisce in particolar modo le articolazioni, ma può colpire anche altri organi e tessuti e per questo viene definita una malattia sistemica. Nelle persone affette da artrite reumatoide si nota un decorso distruttivo della cartilagine e dell'osso lento ma progressivo. Oggi sappiamo che sono i linfociti autoreattivi e le cellule T effettrici a mantenere attiva l'infiammazione con conseguente distruzione dell'osso. Negli anni sono stati utilizzati diversi farmaci per cercare di fronteggiare le malattie reumatiche. I primi ad essere utilizzati sono stati gli anti-infiammatori non steroidei e i corticosteroidi che combattono il processo infiammatorio che si instaura in queste patologie ma non le cause che lo scatenano. In seguito sono stati utilizzati i cosiddetti farmaci biologici, effettori del danno, che riescono a limitare l'evoluzione invalidante della malattia ma allo stesso tempo aumentano il rischio di infezioni e l'insorgenza di sindromi lupus-simili, oltre ad avere un costo talmente elevato da non poter essere utilizzati a lungo termine dai pazienti. Si è quindi tornati a parlare dei DMARD's (disease modifying anti-rheumatic drugs) come combinazione di farmaci esistenti già in commercio o come nuove molecole. I DMARD's infatti riescono a inibire le cellule patogene del sistema immunitario agendo sui meccanismi di attivazione e di proliferazione dei linfociti a monte dell'infiammazione tramite un'azione immunomodulatrice oppure immunosoppressiva. Tra i farmaci di nuova generazione c'è anche il Tofacitinib (CP-690, 550) sul quale abbiamo posto la nostra attenzione. È un farmaco di cui si sa ancora poco; una piccola molecola con un'azione inibitoria nei confronti delle chinasi JAK. Sono stati fatti numerosi studi di Fase 2 e di Fase 3 per valutarne la commerciabilità e l'effettivo uso per i pazienti affetti da malattie reumatiche. Negli USA, la FDA ha autorizzato l'utilizzo di questo farmaco in combinazione con altri farmaci, per esempio il Metotrexate, oppure come farmaco di seconda linea in quei pazienti che non rispondono più a tutte le altre cure. In Europa invece, la produzione e la commercializzazione di questo farmaco è stata respinta dal CHMP a causa della possibile insorgenza di gravi infezioni, perforazioni intestinali e tumori osservati in alcuni pazienti durante le sperimentazioni. Tuttavia, sapendo che il mantenimento dell'infiammazione nell'artrite reumatoide è dovuta alla sovra-regolazione delle citochine pro-infiammatorie

attivate da una sovra regolazione di JAK3, inibita da Tofacitinib, gli studi su questo farmaco continuano, soprattutto perché ancora non si conoscono i suoi effetti a lungo termine. Negli ultimi anni si è scoperto che il suo utilizzo è in grado di bloccare l'attivazione linfocitaria e diminuire l'infiammazione sopprimendo il signaling mediato dall'IL-17 e sopprimendo l'IFN- $\gamma$  con conseguente riduzione della proliferazione sregolata delle cellule T CD4<sup>+</sup> nelle sinovie infiammate nell'artrite reumatoide. Basandoci sullo studio di un altro farmaco utilizzato per stimolare esclusivamente una popolazione di cellule importante per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria, le cellule T regolatorie, abbiamo cercato di sfruttare il blocco dell'azione linfocitaria causata da Tofacitinib e la conseguente ripresa dell'attivazione linfocitaria a seguito della sua rimozione, per vedere se fosse possibile indurre un'espansione selettiva delle cellule T regolatorie. Nel breve periodo questa selezione dei profili cellulari non ha dato buon esito, ma siamo riusciti a mettere a punto un modello che ci permettesse di studiare gli effetti a lungo termine su questa particolare popolazione cellulare dovuti alla somministrazione/rimozione del farmaco. Allo scopo di favorire l'espansione delle cellule T regolatorie rispetto agli altri profili cellulari, abbiamo dato come stimolo alle cellule l'IL-2, citochina di cui le T regolatorie sono molto avidi. Abbiamo eseguito una serie di test citometrici per valutare l'effettiva percentuale di cellule regolatorie presenti e la loro funzionalità. Abbiamo inoltre effettuato uno studio a livello epigenetico di queste cellule valutando il loro grado di metilazione, considerando che questa è la tecnica di eccellenza per riconoscere le cellule T regolatorie funzionali. Infatti dalla letteratura è emerso che anche le cellule T effettrici possono esprimere il fattore di trascrizione FoxP3 finora eletto come molecola selettiva per il riconoscimento assoluto delle cellule T regolatorie. Questa selettività invece è effettiva esclusivamente a livello della metilazione di alcune regioni altamente conservate del gene che permette l'espressione di questo fattore di trascrizione: le regioni TSDR di FOXP3. Con il saggio di metilazione abbiamo quindi valutato il grado di demetilazione delle cellule presenti in coltura. Nel nostro modello sperimentale le cellule sono state divise in più gruppi nei quali abbiamo utilizzato diverse dosi di farmaco permettendoci di ottenere anche dati sulle eventuali differenze riscontrate nell'utilizzo di dosi più o meno elevate. La dose massima utilizzata è ben al di sopra della dose consigliata in terapia, ma si tratta di una quantità che finora ha permesso di evidenziare degli effetti altrimenti non altrettanto visibili con dosi minori. Ciò che abbiamo visto è che dopo due settimane di somministrazione del farmaco, più alta era la quantità di farmaco somministrata, più alta era l'inibizione causata alle cellule T regolatorie. In particolare abbiamo visto come la dose

di farmaco più vicina a quella consigliata in terapia, mostra ancora una buona percentuale di cellule T regolatorie, mentre alla dose massima la quantità di cellule cala notevolmente. Siamo riusciti, tramite un test di soppressione, a evidenziare come buona parte delle cellule in coltura riconosciute come cellule T regolatorie, siano effettivamente funzionali. Tuttavia la loro funzione cala all'aumentare della quantità di farmaco somministrata. Possiamo quindi affermare che, a dispetto di quanto ci aspettavamo inizialmente, somministrare grandi quantità di farmaco per lungo tempo porta ad una diminuzione della quantità di cellule T regolatorie funzionali, affermazione confermata dal saggio di metilazione relativo alle regioni TSDR di FOXP3.

Visti i dati raccolti da questo studio, crediamo sia quindi utile una attenta valutazione dei rischi/benefici a cui l'utilizzo di questo farmaco può portare; infatti se in breve tempo può portare a dei benefici grazie alla sua azione su JAK3, abbiamo visto con il nostro modello sperimentale come con somministrazioni più lunghe di farmaco, queste possano portare ad una diminuzione della quantità di cellule T regolatorie funzionali, percentuali che non aumentano in modo considerevole a seguito della rimozione del farmaco.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis is the common autoimmune inflammatory arthritis in adults. It has a significant negative impact in the quality of life. In this autoimmune disease we observe a slowly but progressive destruction of cartilage and bones. Today we know that the major responsible of maintenance of inflammation are T lymphocytes and effective T cells. In the last decades a lot of drugs were used to try to face rheumatic diseases. First drugs used were anti-inflammatory drugs and corticosteroids but that drugs can only reduce inflammatory situation without solve reason triggers. Then, biological drugs were discovered and used, but they were much expensive and there were increasing risk to develop infections and lupus-like syndrome on use it. So researchers focused their attention on disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARD's) as combination of different DMARDs known yet, or in new DMARD's molecule. DMARDs are able to inhibit immune system's pathogen cells by immunomodulatory or immunosuppressive actions towards lymphocytes upstream of inflammation. One of these new molecules discovered is called Tofacitinib or CP-690, 550 and we focused our attention on it. We don't know a lot about its mechanisms of action, but we know that it had an inhibitory action on JAK-kinases. In the last years, some research groups applied phase 2 and phase 3 clinical trials for investigate use of Tofacitinib on rheumatoid arthritis treatment. In the USA, the Food and Drugs Administration (FDA) approved use of Tofacitinib in combination with other DMARD's, or as last chance for patients who don't react on all other treatments. Instead, in Europe, production and commercialization of CP-690, 550 has been blocked by CHMP, the Committee for Medicinal Products for Human Use. This decision was made because in some patients were saw an increasing of rise infections, intestinal perforation and cancer during clinical trials.

We know that inflammation is due to an over-regulation of pro-inflammatory cytokines activated by an over-regulation of januse-kinase 3 (JAK3), a kinase inhibited by Tofacitinib. A lot of studies were made to better know Tofacitinib actions, and researchers discovered that this drug can block lymphocytes activation and also decreased inflammation by suppression of different mechanism: IL-17 mediated signaling and IFN- $\gamma$  suppression. As result of these suppressions it reduce the de-regulated proliferation of CD4 T cells on inflamed synovium in rheumatoid arthritis.

Immunologists showed that an immune system works properly when it's able to recognize foreign antigens, and when cells responsible of these identification works well. T regulatory cells are necessary to control and regulate these cells. In my study, I decide to verify if it possible to selectively expands regulatory T cells on taking advantage of Tofacitinib mechanism of action. In fact, other researchers have notice that when Tofacitinib was administered to cells, their activation and proliferation were blocked, but when drug was removed from culture, proliferation and activation were resume. In a short period of time, this lineage selection wasn't possible but we developed a method to studying T regulatory cells in culture. In particular we've analyzed Tofacitinib administration / removal effects in this specific population for a long period of time. So, using IL-2 to take care culture cells, a stimulus that the regulatory T cells are greedy, I've controlled T regulatory cells in culture for four weeks. In these weeks we controlled percentage and cells functionality through cytometer tests. Furthermore, an epigenetic study, the methylation assay, was perform. This epigenetic test is the gold test to recognize T regulatory functional cells: in fact, analyzing TSDR region of FOXP3 gene and their level of methylation, we can distinguish functional T regulatory cells to effective T cells. We divided our study in different groups, in which we administered different quantity of drug. After two weeks of Tofacitinib administration we note that the higher amount of drug administered to the cells correspond with the higher inhibition on T regulatory cells. We underline also, with a suppression test, how cells recognize as regulatory T cells are really functional regulatory T cells. The suppression test, however, shown that T regulatory cells function decrease when increase quantity of Tofacitinib was administered to cells in culture.

We could confirm that administered great quantity of Tofacitinib to cells for a long period of time, could cause a decrease of functional T regulatory cells. This point was confirmed by methylation assay on TSDR region of FOXP3 gene.

In agreement with all what we know yet about this particular DMARD, we want to focus about a correct evaluation on benefit/risk about the use of this drug. In fact, if we could see benefit thanks to Tofacitinib actions on JAK3 in short period of time, our study see what happened with administration for longer period of time. We could attend on decrease of functional T regulatory cells, and these amount can't notable increase after removal of drug.

Ringrazio il gruppo del Dr. Tommasini (IRCCS Burlo Garofolo, Trieste) che mi ha permesso di portare avanti questo studio nei suoi laboratori, ed il gruppo del Dr. Bergallo (Ospedale Regina Margherita, UniTO, Torino) senza il quale il saggio di metilazione non sarebbe stato possibile.

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>LA RISPOSTA IMMUNITARIA</b>	<b>3</b>
LA FASE INDUTTIVA DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA	4
<b>AUTOIMMUNITA' E TOLLERANZA</b>	<b>5</b>
TOLLERANZA CENTRALE	7
TOLLERANZA PERIFERICA	8
ANERGIA	9
DELEZIONE	10
CELLULE T REGOLATORIE	10
NATURAL TREGS	11
INDUCED TREGS	13
CELLULE T HELPER 17	14
<b>FoxP3</b>	<b>15</b>
<b>LA METILAZIONE DEL DNA</b>	<b>16</b>
IDENTIFICAZIONE CELLULE T REGOLATORIE IN LABORATORIO	18
<b>LE MALATTIE AUTOIMMUNI</b>	<b>19</b>
LE MA.R.I.C.A. – MALATTIE REUMATICHE INFIAMMATORIE CRONICHE E AUTOIMMUNI	21
ARTRITE REUMATOIDE	22
<b>FARMACI ANTIREUMATICI</b>	<b>24</b>
I FANS	24
I CORTICOSTEROIDI	25
FARMACI BIOLOGICI	26
I DMARD'S - DISEASE MODIFYING ANTI-RHEUMATIC DRUGS	27
TOFACITINIB	27
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>32</b>
<b>PIANO SPERIMENTALE</b>	<b>32</b>
ISOLAMENTO PBMCS	33
ATTIVAZIONE CELLULE T	34
TEST DI SOPPRESSIONE	35
<b>ANALISI DEL FENOTIPO DELLE CELLULE T REGOLATORIE</b>	<b>36</b>
<b>CITOMETRIA A FLUSSO</b>	<b>36</b>
<b>SAGGIO DI METILAZIONE DEL LOCUS TSDR (TREG-SPECIFIC DEMETHYLATED REGION)</b>	<b>38</b>
<b>REAL TIME PCR</b>	<b>43</b>
<b>ESPERIMENTI PRELIMINARI</b>	<b>47</b>
<b>ESPERIMENTI FINALI</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONE</b>	<b>58</b>

<b>APPENDICE</b>	<b>II</b>
<b>ESPERIMENTO PRELIMINARE: INDUZIONE DI LINEAGE CELLULARI SU CELLULE T</b>	<b>II</b>
<b>FOCUS: INDUZIONE DI LINEAGE CELLULARE SU CELLULE T</b>	<b>VI</b>
<b>ESPERIMENTO DI SOLI STIMOLI ALLE CELLULE T</b>	<b>X</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>76</b>

# INTRODUZIONE

## LA RISPOSTA IMMUNITARIA

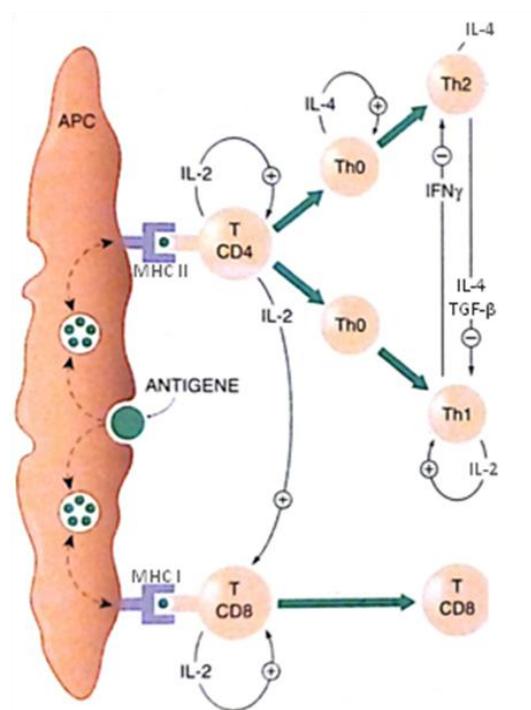
L'uomo è dotato di un sistema omeostatico che gli consente di mantenere l'ambiente interno stabile, ed allo stesso tempo è dotato di meccanismi di difesa capaci di combattere la costante minaccia di infezioni e di promuovere la guarigione e il recupero delle funzioni normali nel caso di lesioni. Questa funzione vitale viene svolta da due tipi di risposta immunitaria: quella innata e quella adattativa (o acquisita). Queste risposte agiscono collaborando con un gran numero di mediatori e di meccanismi, attivando un fenomeno definito infiammazione. Normalmente questa risposta ci protegge, ma talvolta degenera in malattie di origine infiammatoria, rendendo necessario il ricorso all'uso di farmaci che devono attenuare la risposta infiammatoria. Il nostro organismo può contare su una varietà di potenti meccanismi di difesa che possono essere attivati più intensamente per rispondere a una vasta gamma di lesioni. Tuttavia, quando questo avviene l'infiammazione stessa può essere responsabile dei sintomi più importanti della malattia, come nel caso dell'artrite reumatoide. L'attivazione di questi meccanismi di difesa costituisce la reazione infiammatoria acuta, costituita da due componenti: la risposta immunitaria innata che viene attivata immediatamente da un'infezione o da una lesione attraverso un sistema di difesa multiplo che innesca la risposta immunitaria adattativa, e che impedisce che le risposte adattative siano rivolte verso le cellule dell'ospite. Il secondo componente della reazione infiammatoria acuta è la risposta immunitaria adattativa, che si attiva solo dopo che un agente patogeno è stato riconosciuto dalla risposta immunitaria innata. La risposta immunitaria adattativa rende la manovra difensiva dell'organismo ospite più efficace e più specifica. Le cellule chiave di questa risposta sono i linfociti (cellule B, cellule T e cellule Natural Killer). I linfociti T e B portano sulla loro superficie i recettori specifici per gli antigeni che riconoscono e reagiscono con tutte le proteine e i polisaccaridi estranei che si incontrano durante tutta la vita. Le cellule B sono responsabili della produzione di anticorpi mentre le cellule T hanno un ruolo di rilievo nella fase induttiva della risposta immunitaria e sono responsabili delle reazioni immunitarie cellulo-mediate. Nella Fase Induttiva della risposta immunitaria specifica l'antigene viene presentato alle cellule T da parte delle grandi cellule dendritiche (Antigen-Presenting Cells, APC). Al primo contatto con l'antigene i linfociti che lo riconoscono, per mezzo di recettori di superficie specifici per quell'antigene, iniziano a dividersi dando origine ad un grande clone di cellule che

riconosce l'antigene ed è in grado di rispondergli provocando la cosiddetta Fase Effettrice. In questa fase le cellule si differenziano in plasmacellule che producono anticorpi od attivano macrofagi ed uccidono le cellule dell'ospite infettate dal virus, oppure si differenziano in cellule di memoria, così da provocare una risposta immediata e di entità maggiore in un'eventuale seconda esposizione all'antigene. I recettori delle cellule T e B vengono generati in modo casuale e sono in grado di riconoscere sia le proteine dell'ospite sia antigeni estranei; in situazioni di normalità, il corpo non reagisce contro i propri tessuti grazie al meccanismo della tolleranza agli autoantigeni che si sviluppa durante la vita fetale.

### La fase Induttiva della risposta immunitaria

In particolare, nella Fase Induttiva della risposta immunitaria, la molecola antigenica raggiunge i linfonodi dove le APC ingeriscono l'antigene, lo processano e presentano i suoi frammenti sia a cellule T CD4 naive (tramite il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II – MHC classe II) sia a cellule T CD8 naive (tramite il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I – MHC classe I). Le molecole CD4 e CD8 sono dei co-recettori che si trovano sui linfociti T e che cooperano nel riconoscimento dell'antigene coi recettori principali antigene-specifici. Le cellule T CD4<sup>+</sup> a cui è stato presentato l'antigene sintetizzano ed esprimono i recettori dell'Interleuchina 2 (IL-2) ed allo stesso tempo rilasciano questa citochina che stimola le cellule in modo autocrino promuovendo quindi la proliferazione delle cellule che la rilasciano, dando così origine ad un clone di cellule T attivate, chiamate T helper 0 (Th0), che a loro volta danno origine a due sottotipi di cellule helper: Th1 e Th2. Lo sviluppo di cellule Th1 e di Th2 dipende dall'azione di interleuchine specifiche: IL-2 determina la generazione e la proliferazione di Th1, mentre IL-4 (anch'essa autocrina) determina la generazione e la proliferazione di cellule Th2 (Figura 1). La via mediata dalle Th1 controlla prevalentemente le risposte cellulo-mediate, mentre la via Th2 è responsabile per le risposte immunitarie mediate da anticorpi. Le Th2 infatti cooperano con le cellule B del sangue promuovendone la proliferazione, dando così origine a cellule B di memoria e alle plasmacellule che secernono gli anticorpi. È importante inoltre ricordare che le citochine, che agiscono come fattori di crescita autocrini per il proprio sottogruppo cellulare, hanno anche azioni crociate di tipo regolatorio sullo sviluppo dell'altro sottogruppo. Le citochine prodotte da Th1 sono IL-2, TNF $\beta$  e IFN $\gamma$  che oltre ad attivare i macrofagi (che fagocitano e uccidono i microbi) e stimolare i linfociti CD8<sup>+</sup> a rilasciare IL-2 utile alla proliferazione dei linfociti stessi,

inibiscono anche le funzioni delle cellule Th2 tramite l'azione dell' $IFN\gamma$ . Dall'altra parte abbiamo le Th2 che producono IL-4, TGF $\beta$  e IL-10 che stimolano la proliferazione delle cellule B, stimolano il differenziamento e l'attivazione degli eosinofili ed a loro volta inibiscono le funzioni delle cellule Th1 (Figura 1) e quindi l'attivazione delle cellule infiammatorie (e per questo sono spesso considerate degli anti-infiammatori). l'equilibrio tra le funzioni di questi due sottogruppi ha una precisa influenza sulle patologie immunitarie. Le risposte di Th2 sono dominanti in condizioni allergiche come l'asma; quando invece dominano le risposte di Th1 si instaurano delle malattie quali il diabete mellito insulino-dipendente, la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide<sup>2</sup>.



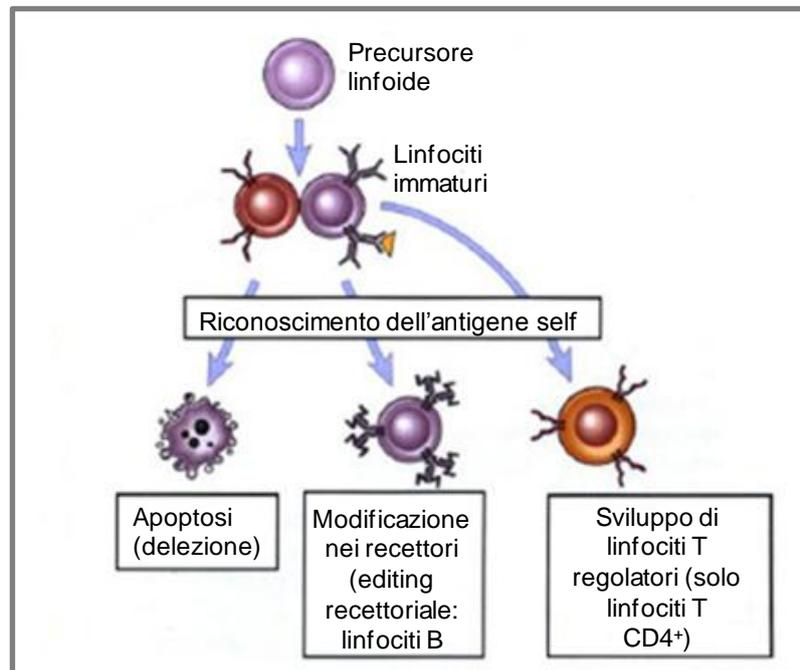
**Figura 1. Incontro con l'antigene e fase induttiva della risposta immunitaria<sup>2</sup>**

## AUTOIMMUNITA' E TOLLERANZA

Esistono delle risposte indesiderate ad antigeni importanti che sono espressi nelle cellule e nei tessuti dell'organismo. Le risposte ad antigeni delle cellule e dei tessuti dell'individuo stesso vengono definite risposte self e provocano autoimmunità, che può portare alle malattie autoimmuni, caratterizzate da danno tissutale.

Durante lo sviluppo del linfocita negli organi linfoidi centrali (midollo osseo e timo) avviene il riarrangiamento genico, che determina inevitabilmente la generazione di alcuni linfociti con affinità per gli antigeni self, che vengono però mantenuti sotto controllo da diversi meccanismi che a loro volta generano uno stato di auto-tolleranza (o tolleranza al self) che permette al sistema immunitario dell'individuo di non attaccare il proprio corpo. Le risposte autoimmuni sono attivate specificamente da antigeni self e danno origine a cellule effettrici autoreattive, gli autoanticorpi, contro l'antigene self. Tuttavia la malattia autoimmune si sviluppa solo se le difese sono state superate al punto da portare ad una reazione intensa al self che comprende la generazione di cellule effettrici e di molecole che distruggono i tessuti. In alcuni casi, i linfociti che hanno un'affinità talmente bassa per gli antigeni self tale da permettergli di ignorarli e di restare inattivi, vengono invece attivati. Uno di questi casi è quello delle cellule B che si attivano a seguito di un'infezione contro le IgG. Le IgG sono presenti in quantità molto elevata nel sangue e in altri liquidi extracellulari, ma le cellule B specifiche per la regione costante delle IgG non vengono attivate perché l'IgG è monomeric (e queste cellule richiederebbero un co-stimolo per essere attivate). A seguito di una grave infezione o di un'immunizzazione però si formano degli immunocomplessi e la quantità di IgG in forma multivalente è sufficiente ad evocare una risposta dalle cellule B che formano il cosiddetto autoanticorpo anti-IgG conosciuto anche come Fattore Reumatoide, presente appunto nell'artrite reumatoide. Questo tipo di risposta normalmente è di breve durata poiché gli immunocomplessi vengono eliminati rapidamente.

## Tolleranza Centrale



**Figura 2. Meccanismi di attivazione della tolleranza centrale (nel timo e nel midollo osseo)<sup>3</sup>**

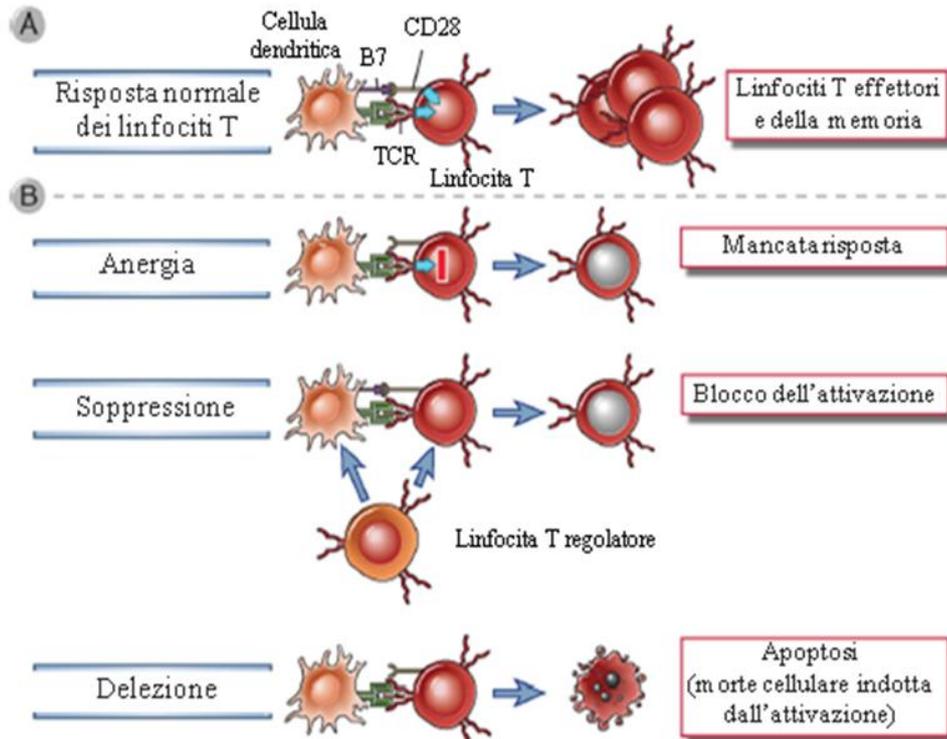
La tolleranza centrale si verifica quando i linfociti incontrano il rispettivo antigene durante il loro processo di maturazione a livello degli organi linfatici centrali (midollo osseo per i linfociti B e timo per i linfociti T). A livello della corticale del timo avvengono le interazioni tra il recettore della cellula T (TCR) e i complessi MHC-peptide esposti dalle cellule epiteliali della corticale del timo, che giocano una parte importante nel destino dei timociti. I timociti esprimono CD4 e CD8 e i recettori T di tipo  $\alpha\beta$ . Una cellula che esprime un recettore capace di riconoscere una molecola MHC di classe I riceve un segnale di sopravvivenza e un segnale di maturazione. Alla fine la cellula smette di esprimere CD4 e mantiene l'espressione di CD8. Si dice che i timociti che ottengono il segnale di sopravvivenza vanno incontro a **selezione positiva**. Anche una cellula che ha un recettore capace di riconoscere una molecola MHC di classe II riceve un segnale di sopravvivenza e un segnale diverso di maturazione, grazie al quale smetterà di esprimere CD8 e manterrà l'espressione di CD4. I timociti che hanno recettori incapaci di riconoscere molecole MHC di classe I o II non ricevono segnali di sopravvivenza e vanno incontro ad apoptosi. Anche i timociti che sono in grado di riconoscere troppo avidamente complessi costituiti da peptidi antigenici e molecole MHC di classe I o classe II ricevono un segnale forte che li conduce

alla morte apoptotica. In questo modo i timociti capaci di rispondere agli antigeni peptidici self sono eliminati in un processo conosciuto come **selezione negativa**, che è alla base della tolleranza centrale. Le cellule T che sopravvivono migrano dalla corticale alla midollare del timo, dove mantengono la capacità di riconoscere gli antigeni self su altre cellule come le cellule dendritiche e i macrofagi del timo e di ricevere un segnale sufficiente ad indurle la morte apoptotica. I timociti che restano, che ora sono cellule singole positive CD4 e CD8 mature naive escono dal timo e ritornano nel circolo ematico.

Tuttavia, una quota di linfociti T resterà comunque reattiva verso gli antigeni self, nonostante tutto il processo di selezione che avviene nel timo. Questi linfociti reattivi si differenzieranno in cellule T regolatrici che migreranno verso la periferia, dove inibiranno la risposta immunitaria verso il self (figura 2).

### Tolleranza Periferica

È un meccanismo particolarmente importante per quegli antigeni che si incontrano fuori dal timo e dal midollo osseo. Si tratta di una tolleranza indotta dai linfociti maturi dopo che le cellule hanno lasciato gli organi linfoidi centrali. In assenza di infezioni, l'incontro di un linfocita naive con un antigene self, specialmente quando la cellula che presenta l'antigene non esprime molecole co-stimolatrici, tende a portare ad un segnale negativo, piuttosto che a nessun segnale. Le cellule T mature infatti, che riconoscono gli antigeni self nei tessuti periferici, diventano incapaci di rispondere a questi antigeni (anergia). Questo meccanismo è molto importante per uccidere o inattivare i linfociti maturi fortemente autoreattivi che non incontrano il self negli organi linfoidi centrali ma solo in periferia. Il sistema immunitario ha sviluppato dei sistemi per controllare le risposte autoimmuni nel caso in cui queste dovessero iniziare. I principali meccanismi della tolleranza periferica sono l'anergia, cioè la mancanza di responsività funzionale, la delezione (morte programmata) e la soppressione da parte delle cellule T regolatorie (Treg) (figura 3B).



**Figura 3 : A) Normale risposta di cellule T; B) meccanismo di tolleranza periferica nei linfociti T<sup>3</sup>**

## Anergia

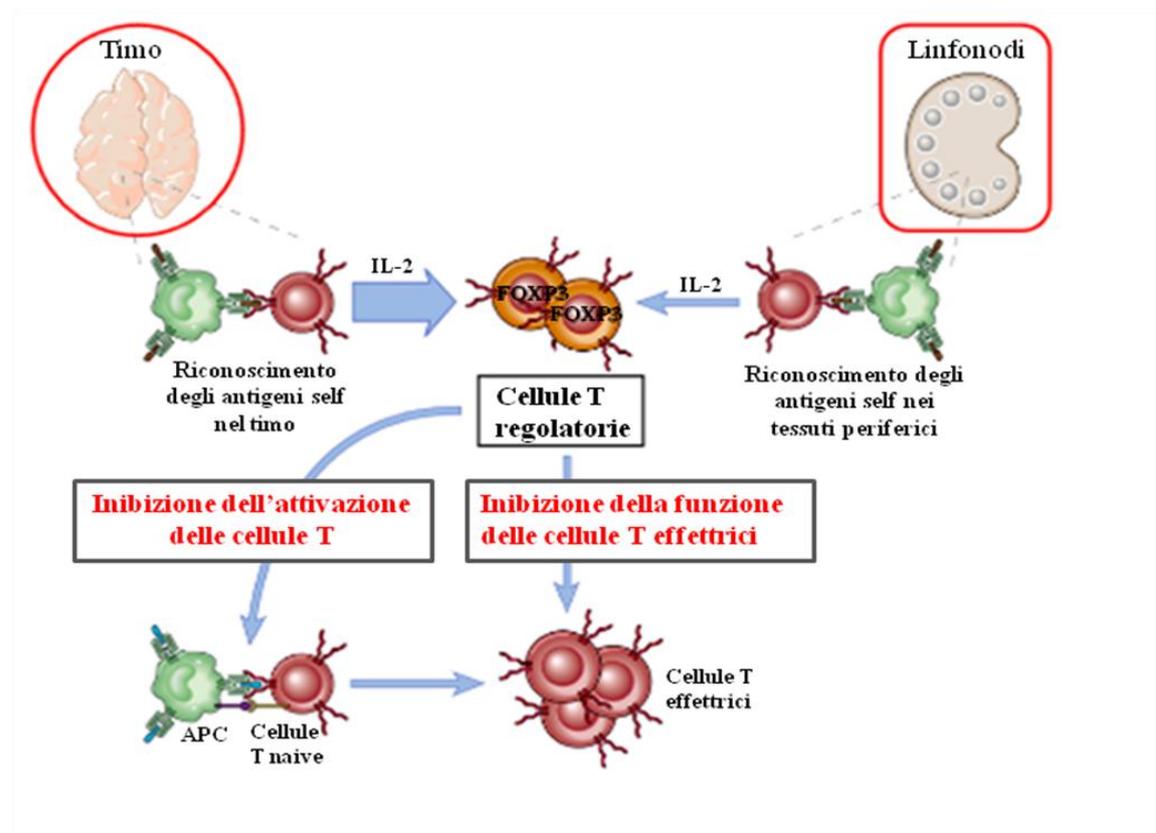
L'anergia si verifica quando il linfocita T maturo incontra il complesso peptide-MHC di una APC priva delle molecole co-stimolatorie, in particolare delle molecole B7 (CD80, CD86). L'attivazione linfocitaria infatti avviene esclusivamente in seguito ad un doppio segnale rappresentato dall'interazione tra recettore linfocitario e antigene (primo segnale) e dall'interazione della molecola CD28 (della cellula T) con la molecola co-stimolatoria B7 (secondo segnale). Ricevere il primo segnale dall'APC ma non il secondo determina nel linfocita uno stato di non responsività funzionale invece del normale stato di attivazione. Un'ulteriore situazione in cui si può riscontrare anergia è in seguito all'utilizzo da parte della cellula T di una molecola inibitoria (CTLA-4) durante l'interazione con le molecole co-stimolatorie dell'APC. Il CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, anche definito CD152) è un recettore appartenente alla famiglia delle Immunoglobuline che viene espresso sui linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> recentemente attivati, che lega le molecole co-stimolatorie B7 espresse dall'APC trasmettendo all'interno del linfocita un segnale inibitorio (autocrino).

## Delezione

La delezione dei linfociti T maturi si verifica in seguito alla persistente stimolazione del linfocita da parte dell'antigene, che porta ad un processo definito morte cellulare indotta dall'attivazione (activation-induced cell death-AICD). Si tratta di una forma di apoptosi indotta da segnali che originano dal recettore Fas presente sulla membrana. Quando la cellula viene ripetutamente attivata esprime sulla sua superficie il ligando Fas-L che interagendo col recettore attiva una serie di caspasi che determinano la morte della cellula. Queste cellule in apoptosi vengono rapidamente rimosse dai fagociti evitando così fenomeni infiammatori. Tutto questo provoca una delezione dei linfociti T specifici per l'antigene che ha provocato la loro ripetuta stimolazione.

## Cellule T regolatorie

Le cellule autoreattive che sono sfuggite ai meccanismi di tolleranza descritti sopra, possono ancora essere regolate per prevenire le malattie autoimmuni. Ci sono infatti delle cellule T, definite regolatorie (Treg) che hanno la capacità di sopprimere i linfociti autoreattivi che riconoscono antigeni diversi da quelli riconosciuti dalle cellule Tregolatorie. Si pensa che le Treg siano delle cellule T moderatamente autoreattive che sfuggono alla delezione che avviene nel timo, e che si differenziano in potenti cellule immunosoppressive capaci di inibire altre cellule T autoreattive che riconoscono antigeni nello stesso tessuto (figura 4). Queste cellule T regolatorie tramite la produzione di citochine possono bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettori.



**Figura 4. Origine e funzioni delle cellule T regolatorie<sup>4</sup>**

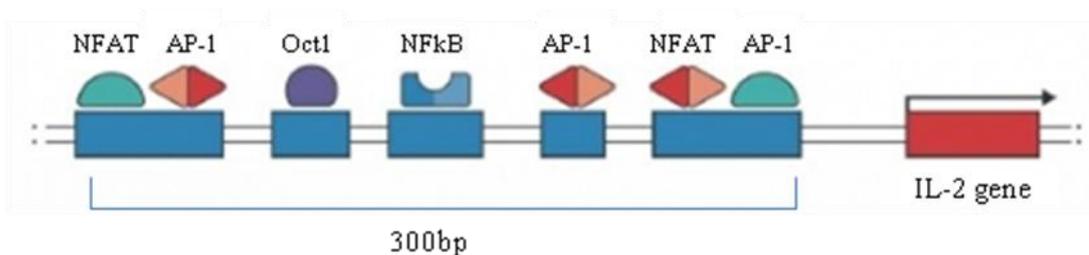
Le cellule T regolatorie che si trovano nei tessuti periferici sono un gruppo eterogeneo di cellule con origine diversa. Rappresentano circa il 5-10% di tutti i linfociti presenti nel sangue periferico umano e possono essere divise in due popolazioni ben distinte: le Treg naturali (nTregs) e le Treg indotte (iTregs) che si suddividono a loro volta in Thelper3 (Th3) e le T regulatory 1 (Tr1).

### Natural Tregs

Un sottogruppo di cellule T regolatorie si differenzia durante lo sviluppo nel timo. Sono le Tregolatorie naturali,  $CD4^+$  e che esprimono la catena  $\alpha$  del recettore per Interleuchina 2 (IL-2R $\alpha$  o CD25), e livelli elevati del recettore CD62L della L-selectina. Gli alti livelli nell'espressione del CD25 sulle Tregolatorie suggerisce l'importanza dell'IL-2 per queste cellule<sup>5</sup>. Le Tregolatorie naturali rappresentano circa il 5-10% delle cellule CD4 in circolo. Queste cellule esprimono il fattore di trascrizione FoxP3 che interferisce con l'interazione tra AP-1 (Activator Protein-1) e NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) sul promotore dell'IL-2 (figura 5) impedendo la trascrizione del gene IL-2. L'IL-2 viene prodotta dalle stesse cellule T attivate per promuovere la loro proliferazione e

differenziazione. Il recettore dell'IL-2 è costituito da 3 catene:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Quando le cellule T sono a riposo esprimono una forma del recettore costituita dalle sole catene  $\beta$  e  $\gamma$  che permette il legame con l'IL-2 a bassa affinità consentendo quindi alle cellule T quiescenti di rispondere solo a concentrazioni di IL-2 molto elevate. Quando anche la catena  $\alpha$  si associa alle altre due catene si forma un recettore ad affinità molto più elevata per l'IL-2 che permette alla cellula di rispondere a concentrazioni molto basse di IL-2. Il legame dell'IL-2 col recettore ad alta affinità induce la replicazione cellulare. Le cellule T attivate in questo modo si possono dividere due o tre volte al giorno per molti giorni permettendo ad una singola cellula di originare un clone di migliaia di cellule che esprimono lo stesso identico recettore per l'antigene. L'IL-2 costituisce un fattore di sopravvivenza essenziale per queste cellule e la sua rimozione determina la morte per le cellule T attivate. L'IL-2 inoltre promuove il differenziamento delle cellule attivate nei linfociti T effettori. Questa citochina gioca un ruolo centrale nello sviluppo e nella funzione dei Tregs: la mancanza di questa molecola o del suo recettore può portare ad un difetto di cellule Tregolatorie, ma questo meccanismo non è ancora molto chiaro <sup>6</sup>. È probabilmente l'interruzione di questo meccanismo IL-2 dipendente a promuovere l'insorgenza di disordini di tipo infiammatorio od autoimmune <sup>7,8</sup>.

Quando vi è il riconoscimento dell'antigene da parte del recettore della cellula T, vi è la sintesi o l'attivazione dei fattori di trascrizione NFAT, AP-1 e NFkB (Nuclear Factor kB) che si legano alla regione promotrice del gene IL-2 e sono essenziali per attivare la sua trascrizione.



**Figura 5. I diversi elementi regolatori che permettono la trascrizione dell'IL-2. AP-1, NFAT e NFkB si legano al promotore del gene IL-2 promuovendo tramite i diversi segnali la produzione dell'interleuchina. La MAP chinasi attiva AP-1; il calcio attiva NFAT; la protein chinasi C attiva NFkB. Oct1 è un fattore di trascrizione necessario per la trascrizione di IL-2 <sup>9</sup>.**

Le Tregolatorie naturali sono potenzialmente cellule T autoreattive che vengono selezionate nel timo da un legame con elevata affinità con molecole MHC che presentano peptidi self. Una volta attivate possono mediare i loro effetti o tramite contatto grazie

all'espressione del CTLA-4 e di TGF- $\beta$  che impediscono l'espressione del CD25, o secernendo Interleuchina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ). Queste citochine possono inibire la proliferazione della cellula T attivando il fattore di trascrizione FoxP3 che impedisce l'interazione tra i fattori di trascrizione sui promotori del gene che codifica per IL-2. L'IL-10 può anche influenzare la differenziazione delle cellule dendritiche inibendo la secrezione dell'Interleuchina 12 (IL-12), esercitando così una potente attività inibitoria nei confronti delle cellule T naive CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, sulle cellule T di memoria e sulle cellule T effettrici CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Questa attività immunosoppressiva consente di mantenere la tolleranza periferica al self inibendo eventuali cloni di linfociti T autoreattivi ed evitando così la comparsa di malattie autoimmuni.

### Induced Tregs

In periferia, dalle cellule T CD4 naive apparentemente non ancora attivate, si possono formare delle cellule Tregolatorie, definite indotte o acquisite (iTregs). Si tratta di un gruppo eterogeneo che comprende diversi sottogruppi con fenotipi diversi, proprietà diverse e condizioni diverse che favoriscono la loro differenziazione. Le iTregs infatti possono suddividersi in T helper 3 (Th3), o Tr1. Le cellule Tr1 sono capaci di produrre grandi quantità di IL-10, una citochina pro-infiammatoria in grado di inibire l'attivazione dei macrofagi<sup>5</sup>. Secernono anche la citochina inibitrice TGF- $\beta$  ma non l'IL-4, e questo ci permette di distinguerle dalle cellule Th3. Possono essere coltivate in vitro in presenza di alte concentrazioni di IL-10 e il loro sviluppo è favorito anche dall'IFN- $\alpha$ . Le cellule Th3 si trovano nel sistema immunitario delle mucose e producono IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , ed è grazie a quest'ultimo che si differenziano dalle Th2. La produzione di grandi quantità di TGF- $\beta$  inibisce la proliferazione sia dei linfociti T che dei linfociti B. Sono attivate dalla presentazione dell'antigene nelle mucose e sembra che in questi distretti, che fungono da barriere al mondo pieno di microbi, funzionino per annullare o controllare le risposte immunitarie. La mancanza di questo tipo di cellule è legato alle malattie autoimmuni ed infiammatorie dell'intestino. Queste cellule vengono spesso attivate a seguito del cosiddetto meccanismo di tolleranza orale per cui l'antigene proteico viene somministrato per via orale portando alla soppressione delle risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate verso l'antigene.

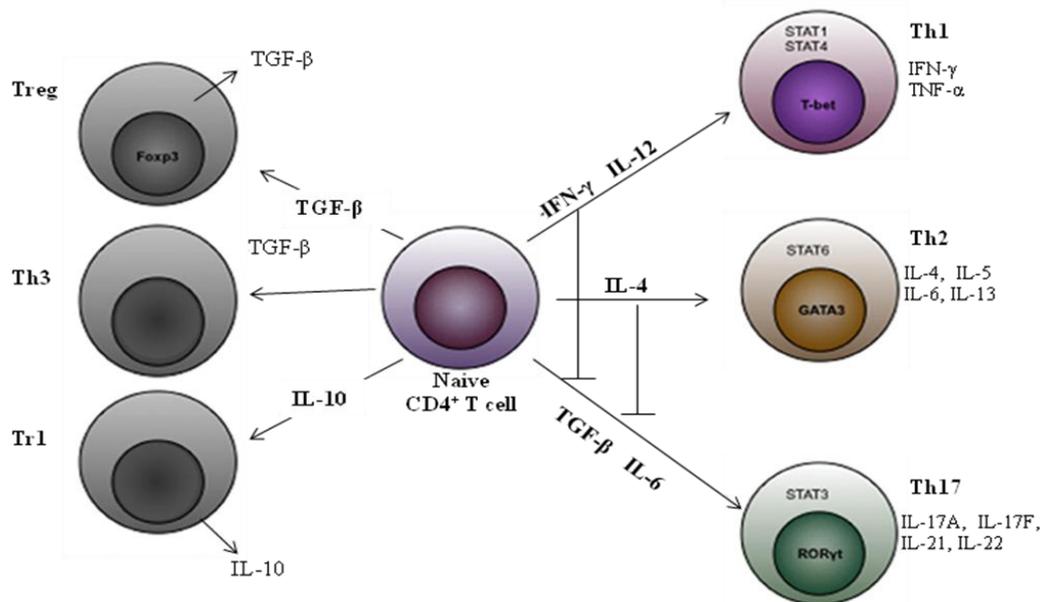
Le cellule iTregs costituiscono il 30% dei Tregs FOXP3<sup>+</sup>, ed acquisiscono l'espressione del marcatore CD25 in seguito alla stimolazione da parte di specifici antigeni ed in

presenza di particolari citochine. Fenotipicamente parlando, le cellule regolatorie indotte e quelle naturali sono sostanzialmente simili ma si riscontrano delle differenze nel mantenimento dell'attività soppressiva e nella loro dipendenza a diverse citochine<sup>10</sup>.

## Cellule T helper 17

È bene ricordare anche l'esistenza delle cellule Thelper17 (Th17). È un tipo di cellula effettrice, così come le cellule Th1 e Th2. Si differenziano nelle fasi precoci della risposta immunitaria acquisita: infatti la differenziazione delle cellule T CD4 naive in classi distinte di cellule T CD4 effettrici (Th17, Th1, Th2, o sottogruppi regolatori) avviene durante la progressione di un'infezione e dipende dagli effetti dell'infezione sulle cellule che presentano l'antigene. Sono le condizioni create dalle cellule dendritiche durante il contatto iniziale delle cellule con il loro antigene che determina le quantità relative dei diversi tipi di cellule T prodotte. Il primo sottogruppo di cellule T effettrici che viene generato è spesso quello delle Th17. Infatti, la risposta più precoce delle cellule dendritiche dopo l'incontro con il patogeno è quella di sintetizzare Interleuchina 6 (IL-6), insieme al TGF- $\beta$ . Queste citochine, in assenza di IL-4, IFN- $\gamma$  o IL-12 inducono la differenziazione delle cellule T CD4 naive in Th17. Le cellule Th17 lasciano il linfonodo e migrano in sedi distanti dall'infezione dove incontrano gli antigeni del patogeno e vengono stimulate a sintetizzare e rilasciare citochine facenti parte della famiglia delle IL-17. Il recettore per l'IL-17 è espresso in modo ubiquitario su cellule epiteliali, fibroblasti e cheratinociti, e a contatto con il ligando induce queste cellule a secernere citochine e chemochine utili ad attirare i neutrofili nella sede dell'infiammazione.

È in realtà l'equilibrio nella produzione di IL-6 e di TGF- $\beta$  a portare le cellule T CD4<sup>+</sup> naive a differenziarsi in cellule regolatorie o in Th17. In assenza di infezione infatti predomina la produzione di TGF- $\beta$  da parte delle cellule dendritiche, mentre la produzione di IL-6 rimane piuttosto bassa e questo conduce alla stimolazione del fattore di trascrizione FoxP3 con conseguente espressione di un fenotipo di tipo regolatorio. Al contrario, quando si è in presenza di infezione, la produzione di IL-6 da parte delle cellule dendritiche aumenta a discapito di quella del TGF- $\beta$  portando alla stimolazione del recettore nucleare ROR- $\gamma$ t (Retinoic acid-related Orphan Receptor  $\gamma$ t) e quindi all'espressione di cellule Th17 che indurranno le cellule dell'epitelio a secernere chemochine che attireranno cellule infiammatorie come i neutrofili nel sito dell'infezione.



**Figura 6.** Possibili differenziazioni di una cellula T CD4<sup>+</sup> naive e citochine implicate nella differenziazione e nel mantenimento dei diversi profili <sup>11</sup>.

## FoxP3

FoxP3 (forkhead box P3, Scurfin o JM2) è un fattore di trascrizione, membro della sottofamiglia P dei fattori di trascrizione Fox, un gruppo caratterizzato dalla presenza di un dominio *forkhead/winged-helix* altamente conservato. Si tratta di una proteina di 49-55 kDa, espressa dai linfociti regolatori CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Il gene che codifica per questa proteina è localizzato sul braccio corto del cromosoma X ed è costituito da 11 esoni che codificano per una proteina di 431 amminoacidi. L'introne 1 di Foxp3 (che corrisponde a CNS2 (sequenza conservata non codificata 2) è specificatamente demetilato nelle cellule nTregs e l'ipometilazione è stabile a seguito di stimolazione tramite TCR, proliferazione cellulare o trattamenti con citochine (IL-2 o TGF-b)<sup>12</sup>.

Nei topi sani l'espressione di foxP3 è maggiore nelle cellule Tregolatorie, bassa nelle cellule CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> e quasi assente nelle cellule TCD8<sup>+</sup>.

FOXP3 è risultato essere il gene difettivo nel modello animale della sindrome IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome), il topo *scurfy*. Mutazioni di FOXP3 nell'uomo portano ad un ridotto sviluppo e ad un

malfunzionamento delle cellule Tregolatorie e di conseguenza, alla sindrome IPEX caratterizzata da un esordio precoce di diverse manifestazioni autoimmuni a carico dell'intestino, del sistema endocrino e della pelle <sup>13</sup>. È stato grazie all'identificazione delle mutazioni a carico del gene FOXP3 che sono stati condotti i primi studi riguardanti il fattore di trascrizione foxP3 codificato da questo gene, e questo ha permesso di scoprire il suo ruolo nel mantenimento della tolleranza immune attraverso la sua espressione sulle cellule Tregolatorie CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Infatti, è solo grazie alla sua espressione sulle cellule T regolatorie che queste possono svolgere il loro ruolo di mediatori nei confronti delle altre cellule, a causa dell'interazione che FoxP3 opera nell'interazione di AP-1 e NFAT sul promotore del gene dell'IL-2 impedendone la trascrizione e di conseguenza la proliferazione delle cellule T effettrici. Il fenotipo regolatore alle cellule CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> è quindi insito nell'espressione di FoxP3 in tali cellule.

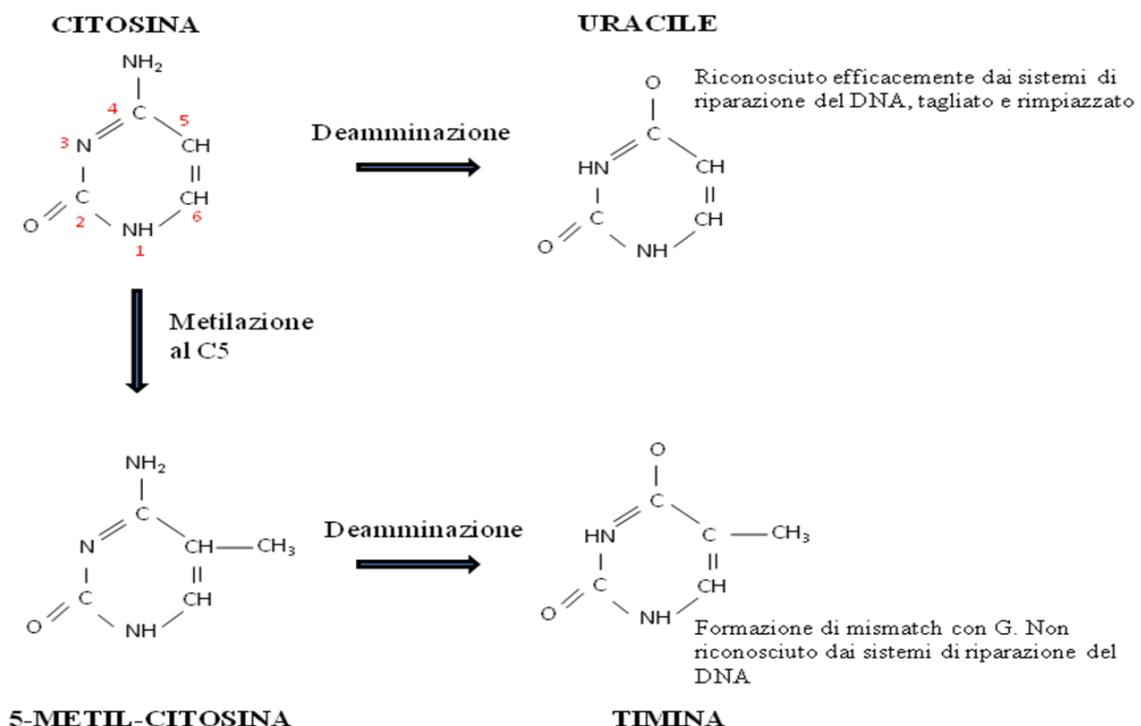
Nonostante ciò, l'espressione di FoxP3 può essere un fenomeno transitorio durante l'attivazione linfocitaria: cellule FoxP3<sup>+</sup> create in laboratorio tendono frequentemente a perdere il loro fenotipo regolatorio nel momento in cui vengono infuse in vivo nell'animale da laboratorio. La stabilità delle cellule regolatorie sembra dipendere da cambiamenti epigenetici tra i quali la metilazione del DNA in precise regioni introniche al 5' chiamate Treg Specific Demethylation Regions (TSDR) presenti a livello del gene FOXP3. Se la regione TSDR, che controlla la stabilità del gene, risulta geneticamente deleta, le cellule Tregolatorie perdono l'espressione del gene FOXP3 e di conseguenza la loro azione regolatoria <sup>14</sup>.

## La Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è una modificazione del genoma che avviene dopo la replicazione ad opera di enzimi chiamati DNA metiltransferasi. Nei batteri questa metilazione può interessare sia l'adenina che la citosina, e viene utilizzata per distinguere il DNA estraneo dal proprio, di conseguenza viene utilizzato come difesa contro l'invasione da DNA estraneo. Nei vertebrati invece questa modificazione avviene esclusivamente nei confronti delle citosine del DNA che si trovano al 5' di una guanosina (dinucleotide CpG): l'enzima DNA metiltransferasi aggiunge un gruppo metile (-CH<sub>3</sub>) al carbonio 5 della citosina provocando così la formazione di una 5-metilcitosina (figura 7). Il genoma dei mammiferi è quasi del tutto metilato ad eccezione di alcune zone ricche di questi dinucleotidi CpG

(definite Isole CpG). Queste isole abbondano nelle regioni promotrici dei geni eucariotici. La metilazione fisiologica di queste regioni è un fenomeno che interviene nel controllo dell'espressione genica, nell'inattivazione del cromosoma X e nella struttura cromatinica. Nel genoma umano quasi l'80% delle sequenze CpG sono metilate. La metilazione (e la demetilazione) regolano l'accensione e lo spegnimento di alcuni geni.

La 5-metil-citosina (5mC) è più instabile e soggetta a mutazioni rispetto alla citosina non modificata e tende a deaminare. La deaminazione della citosina causa la formazione di uracile (base che appartiene all'RNA e di conseguenza viene subito riconosciuto come estraneo) mentre la deaminazione della 5mC porta alla timina che non si appaia più con la guanina presente sull'altro filamento del DNA, creando così un *mismatch* che non sempre viene risolto (Figura 7).



**Figura 7. Metilazione di una Citosina in 5-metil-citosina. Sono anche mostrate le possibili reazioni di deaminazione a carico della citosina, che viene deaminata ad Uracile, e della 5-metil-citosina che viene deaminata a Timina.**

Eventuali cambiamenti nei pattern delle citosine metilate rivestono un ruolo cruciale durante lo sviluppo e sono stati associati a cancro ed altre malattie. A causa del suo ruolo chiave nel definire la salute o la malattia nell'uomo, la metilazione delle citosine è la modificazione epigenetica più studiata fra tutte. La tecnica più usata per studiarla in questo momento richiede l'utilizzo del trattamento con il bisolfito, grazie al quale l'informazione

epigenetica viene trasformata in un'informazione genetica convertendo le citosine, ma non le 5-metil-citosine, in uracile<sup>15,16</sup>. Il trattamento col bisolfito, che viene comunemente definito il Metodo Bisolfito, altro non è che una modificazione biochimica dovuta al sodio bisolfito che viene utilizzata per distinguere sul genoma umano le isole CpG metilate e quelle non metilate. Nel dettaglio, il sodio bisolfito deammina la citosina presente sul filamento singolo del DNA, e come prodotto indiretto di questa deaminazione si forma 5,6-dihydrocytosine -6- sodium sulphonate, a pH acido. Vi è quindi un cambiamento dell'ambiente che diventa alcalino e provoca la degradazione del sodio bisolfito con la produzione indiretta di uracile. In realtà, anche la 5 metil-citosina potrebbe andare incontro a deaminazione e trasformarsi in timina, ma questa trasformazione è talmente lenta rispetto alla reazione provocata dal sodio bisolfito sulla citosina che ciò non avviene mai<sup>17</sup>.

E' stato dimostrato che FOXP3 è il marcatore più specifico ed il più usato per identificare le cellule T regolatorie a causa del suo ruolo centrale nel controllare lo sviluppo e le funzioni di queste cellule<sup>18</sup>. Recentemente, è stato descritto un nuovo marcatore che permette di identificare e di quantificare le cellule T regolatorie nell'adulto: è la demetilazione del DNA nella regione TSDR di FOXP3, sia nel topo che nell'uomo adulto, a coincidere con una generazione stabile di cellule T regolatorie. La demetilazione delle isole CpG di FOXP3 si nota specialmente sulle cellule T regolatorie naturali, ma non completamente nelle cellule naive che ancora non esprimono il CD25 o nelle cellule coltivate in vitro utilizzando TGF- $\beta$  per indurre la produzione di Tregs FOXP3<sup>+</sup><sup>19</sup>. La stabilità dell'espressione di FOXP3 è stata riscontrata solo sulle cellule che sono demetilate nelle regioni TSDR<sup>20</sup>. Di conseguenza è stato suggerito che siano proprio le regioni TSDR ad essere gli elementi che regolano l'espressione del gene di FOXP3. E' stato provato che la demetilazione delle regioni TSDR di FOXP3 è specifica per le cellule Tregolatorie esclusivamente nell'adulto. È utile inoltre ricordare che il gene di FOXP3 si trova sul braccio corto del cromosoma X. Questo significa che, per calcolare la quantità di cellule Tregolatorie in un campione di cellule provenienti da una donna, bisogna moltiplicare di un fattore 2 il risultato ottenuto per poter determinare il vero numero di cellule Tregolatorie presenti<sup>21</sup>.

## Identificazione cellule T regolatorie in laboratorio

FOXP3 viene utilizzato come marcatore di superficie specifico per le cellule T regolatorie, in particolare per quelle funzionali. Infatti, per identificare e classificare le Treg vitali è

necessario caratterizzare numerosi altri marcatori di superficie. Il CD127 umano è una glicoproteina espressa dalle cellule B immature, dai timociti durante lo sviluppo e dalla maggior parte delle cellule T mature. Complessa con il CD132, conosciuto come catena gamma, per formare il recettore multi-funzionale per IL-7 (IL-7R). Il recettore alfa dell'Interleuchina 7 (IL-7R $\alpha$ , o CD127) è un marcatore che è sotto regolato sulle cellule T regolatorie, ed è assieme ai marcatori CD4 e CD25 che questi bassi livelli di CD127 ci permettono di individuare questo tipo di cellule. Un altro marcatore che viene utilizzato per individuarle è il CD45RA che si trova anch'esso sotto regolato nelle cellule T regolatorie attivate, mentre mostra alti livelli quando la cellula non è ancora attivata. Le cellule Tregolatorie non attivate, se stimolate, possono aumentare l'espressione di FOXP3 e convertirsi così in cellule attivate e proliferare. Allo stesso tempo però, inibiscono la conversione di altre cellule non attivate in attivate, creando così un controllo sulla quantità di cellule Tregolatorie funzionali.

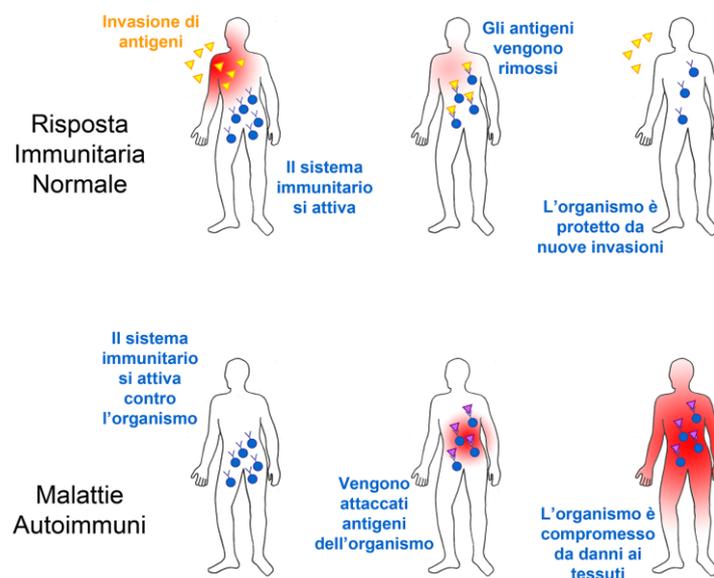
Uno studio condotto nel 2012 sulla quantificazione delle cellule Tregolatorie utilizzando il Saggio di Metilazione su pazienti sani ha mostrato come le cellule Tregolatorie possano essere identificate in maniera corretta come cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alte</sup> e CD127<sup>basse</sup>, poiché questa categoria di cellule mostra una demetilazione delle regioni TSDR di FOXP3 pari al 99,8%. Esistono tuttavia altre due categorie, quella che identifica le cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>medie</sup> che mostra una demetilazione pari al 4,4% e un'ultima categoria che identifica le cellule Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>basse</sup> con una demetilazione pari allo 0,8% <sup>22</sup>.

Le cellule Tregolatorie sono sempre più studiate a causa del loro ruolo nei confronti della regolazione del sistema immunitario. Riuscire a comprenderle nelle loro diverse sfaccettature potrebbe permetterci di controllarne le funzioni sviluppando strategie utili a limitare, o ancor meglio, a prevenire l'insorgenza delle malattie autoimmuni, ad aumentare la tolleranza nei trapianti e magari a promuovere l'attivazione del sistema immunitario contro le cellule tumorali.

## LE MALATTIE AUTOIMMUNI

Le malattie autoimmuni sono patologie caratterizzate da una scorretta funzionalità del sistema immunitario, che attacca e distrugge i tessuti sani del proprio organismo perché li riconosce erroneamente come estranei (Figura 8).

Come abbiamo detto in precedenza, il nostro organismo è normalmente sottoposto all'attacco di numerosi antigeni esterni contro i quali deve attivare una risposta immunitaria per poterli eliminare. Si attiva di conseguenza una risposta infiammatoria come meccanismo di difesa, il cui ruolo è quello di riportare alla norma le funzioni dei tessuti infettati o danneggiati. La guarigione, che è la fase risolutiva della risposta infiammatoria, rappresenta anch'essa un processo attivo che utilizza una serie specifica di mediatori e citochine per porre fine all'infiammazione residua e promuovere il rimodellamento e la riparazione del tessuto danneggiato. Ciò che si ottiene quindi è la distruzione del patogeno e la produzione di un gruppo espanso di linfociti di memoria pronti ad attivarsi nel momento in cui il patogeno dovesse ripresentarsi <sup>2</sup>.



**Figura 8. la risposta immunitaria normale e autoimmunità a confronto<sup>23</sup>**

Nell'autoimmunità invece questo non avviene perché l'organismo, a causa della perdita della tolleranza al self, riconosce come estraneo quello che invece è un antigene self, che non può essere facilmente eliminato dato che è presente in largo eccesso ed è ubiquitario. Alcune malattie autoimmuni possono essere innescate da agenti infettivi che esprimono epitopi che assomigliano agli antigeni self e che portano alla sensibilizzazione del paziente contro tale tessuto. Il fatto che gli autoantigeni siano ubiquitari, porta le malattie autoimmuni ad evolvere verso la cronicizzazione: si instaura un'infiammazione cronica che continuerà per mesi, e perfino anni, e che implicherà la distruzione del tessuto. Le malattie autoimmuni sono caratterizzate da una fase precoce di attivazione, col coinvolgimento di soli pochi auto-antigeni, seguita da uno stadio cronico, dovuto alla presenza costante dell'auto-antigene che porta ad un'infiammazione cronica, che a sua

volta indurrà il rilascio di più autoantigeni come conseguenza di un danno tissutale. Questo meccanismo porta al reclutamento di cellule effettrici non specifiche, come macrofagi e neutrofili, che rispondono al rilascio di citochine e chemochine dai tessuti danneggiati provocando un processo autodistruttivo continuo. Vi sono delle malattie autoimmuni in cui l'espressione dell'autoimmunità è limitata ad organi specifici, come avviene per la sclerosi multipla, il diabete mellito di tipo I, la tiroidite di Hashimoto ed altre patologie, mentre altre malattie vedono l'espressione dell'autoimmunità coinvolgere più tessuti e vengono definite malattie autoimmuni sistemiche. Tra queste vi sono l'artrite reumatoide, la sindrome di Sjögren e il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) <sup>24</sup>.

Sia le cellule B che le cellule T sono coinvolte in tutte le malattie autoimmuni, anche nei casi in cui un tipo particolare di risposta predomina nel causare il danno tissutale.

## LE MA.R.I.C.A. – Malattie Reumatiche Infiammatorie Croniche e Autoimmuni

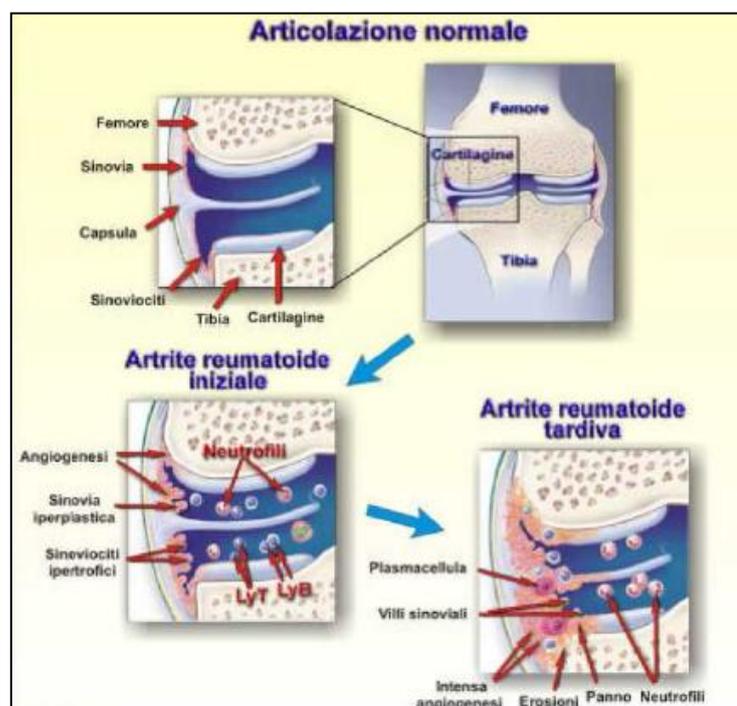
Si tratta di un gruppo di patologie di cui non è nota la causa. In Italia le malattie reumatiche colpiscono più di cinque milioni di abitanti, con predilezione per le donne. Sono malattie che colpiscono indistintamente soggetti rientranti in tutte le fasce di età. Tutte queste malattie reumatiche mostrano il coinvolgimento selettivo del tessuto connettivo ed in particolare della matrice extracellulare che viene implicata nel processo infiammatorio, che diventa cronico, nel quale vediamo coinvolti diversi distretti (pelle, ossa, cuore, reni, occhi ed altri ancora). Le M.A.R.I.C.A. sono caratterizzate da spiccata disabilità e da un'evoluzione invalidante. Per questo motivo hanno un forte impatto sociale a causa dell'alta incidenza, dei costi economici e della riduzione della qualità della vita per i soggetti che ne soffrono. I soggetti portatori di MA.R.I.C.A. presentano problematiche comuni, derivanti dalla convivenza cronica con la disabilità e la necessità di cure e controlli a tempo indeterminato. Si distinguono in due grandi gruppi: le forme degenerative e funzionali (artrosi e fibromialgia) che sono le affezioni più frequenti fra i pazienti reumatici in Italia, e le forme infiammatorie e autoimmuni, in cui troviamo l'Artrite Reumatoide, le spondiliti, l'artrite psoriasica, il Lupus Eritematoso Sistemico, la sclerodermia, la dermatomiosite, la sindrome di Sjögren, le vasculiti ed altre ancora. Di nessuna di tutte queste patologie è finora nota la causa. Sono stati condotti innumerevoli studi che sembrano dare adito all'ipotesi di una predisposizione genetica del sistema immunitario che, se stimolato da fattori esterni, potrebbe innescare una reazione

infiammatoria anomala, rivolta verso strutture biologiche dello stesso organismo portando ad una condizione infiammatoria cronica. Tutti gli organi e tessuti del sistema immunitario possono essere colpiti dal processo infiammatorio nelle malattie autoimmuni. In alcune di queste malattie il coinvolgimento articolare è preponderante e vengono per questo denominate artriti. Nelle poliartriti croniche (artrite reumatoide, artrite psoriasica e spondilite) si determina una progressiva alterazione distruttiva della struttura anatomica articolare che, nel corso degli anni, porta alla perdita della normale capacità di movimento. Questo può portare all'invalidità con persistente dolore e tumefazioni di diverse articolazioni. In tutte le MA.R.I.C.A. il processo infiammatorio sistemico, insieme alla presenza di alcuni auto-anticorpi, rappresenta un fattore di rischio aggiuntivo per l'aterosclerosi. È proprio quest'ultima a provocare la maggioranza delle complicanze cardio-cerebro-vascolari che sono le vere responsabili della riduzione di aspettativa di vita in questi soggetti<sup>25</sup>.

## ARTRITE REUMATOIDE

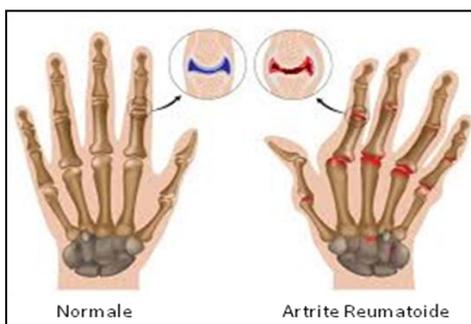
L'artrite reumatoide (RA) è una malattia cronica autoimmune caratterizzata da infiammazione intensa della sinovia, rivestimento dell'articolazione, la cui causa scatenante è ancora oggi sconosciuta. Può insorgere a qualsiasi età a partire dall'adolescenza, anche se il periodo critico varia tra i 30 ed i 50 anni, ed è più comune nelle donne.

È una malattia infiammatoria cronica che colpisce prevalentemente le articolazioni (in modo simmetrico) ma può colpire altri organi e tessuti (cuore, polmoni, reni, occhi) e per questo viene definita malattia sistemica. L'infiammazione sistemica che



**Figura 9. Le fasi dell'artrite reumatoide** (a cura del Dott. Ferrante A.)

si instaura può portare all'aterosclerosi, come nelle altre MA.R.I.C.A., con infarti del miocardio ed ictus. Il decorso distruttivo della cartilagine e dell'osso è lento ma progressivo (figura 9): man mano che la patologia progredisce, la sinovia infiammata invade e lesiona la cartilagine con conseguente erosione dell'osso. Inizialmente l'artrite reumatoide è stata considerata una malattia autoimmune determinata principalmente da cellule B che producono autoanticorpi anti-IgG, definiti fattore reumatoide. Tuttavia, non è stato riscontrato questo fattore in tutti i pazienti affetti dalla malattia, suggerendo quindi l'esistenza di un meccanismo più complesso alla base della patologia. Oggi l'artrite reumatoide è classificata come malattia mediata dalle cellule T; sono infatti i meccanismi indotti da cellule T e da anticorpi a causare le lesioni ai tessuti. L'infiammazione della membrana sinoviale infatti richiama i linfociti autoreattivi e i macrofagi nel tessuto infiammato. Le cellule T CD4 effettrici autoreattive attivano i macrofagi con la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$ . I macrofagi attivati, le cellule T, le cellule B e i neutrofili migrano in continuazione verso il sito dell'infiammazione, vi aderiscono e si trattengono nel tessuto sinoviale articolare. I fibroblasti attivati dalle citochine producono metallo-proteinasi della matrice che contribuiscono alla distruzione del tessuto. La membrana sinoviale delle articolazioni aumenta di volume provocando la formazione del cosiddetto panno sinoviale che invade la cartilagine provocandone l'erosione e la graduale distruzione. Si tratta di un processo proliferativo che si estende fino all'osso. Un componente della famiglia del TNF che viene espresso da cellule T e fibroblasti nell'articolazione infiammata, è l'attivatore principale degli osteoclasti che distruggono l'osso. Vengono successivamente aggrediti



**Figura 10. Mano affetta da Artrite Reumatoide** (da ANMAR:Associazione Nazionale Malati Reumatici Onlus)

dall'infiammazione anche tendini e legamenti, e tutto ciò porta ad una deformazione articolare che determina una perdita della capacità funzionale delle articolazioni con disabilità <sup>24</sup>. Sono tipicamente colpite le piccole articolazioni di mani e piedi con tumefazione e rigidità in fase precoce, mentre in fase tardiva si manifestano deformità, noduli e ipotrofia muscolare. Caratteristiche di questa patologia sono anemia, febbre e debolezza muscolare. I pazienti con artrite reumatoide accusano dolore cronico, rigidità articolare mattutina, tumefazione e perdita della funzione fino ad arrivare all'invalidità <sup>2</sup>. È possibile che questa malattia compaia in età pediatrica, nel qual caso viene definita artrite

reumatoide giovanile. È una malattia a decorso ciclico che vede alternarsi momenti di acutizzazione a momenti di remissione della malattia <sup>26</sup>.

## FARMACI ANTIREUMATICI

È solo negli ultimi anni che si è iniziato a prendere coscienza della malattia. Questo ha modificato l'approccio terapeutico pre-esistente che prevedeva di iniziare la terapia con farmaci antireumatici solo quando la malattia era ormai in fase estremamente avanzata. Oggi infatti, si punta a terapie molto più precoci ed aggressive.

Le alterazioni delle articolazioni comprendono infiammazione, proliferazione della sinovia ed erosione della cartilagine e dell'osso. Un ruolo importante nella patogenesi di questa malattia è di sicuro rivestito dalle principali citochine infiammatorie implicate: IL-1 e il TNF- $\alpha$ . Per fronteggiare le malattie reumatiche sono stati utilizzati negli anni diversi farmaci <sup>2</sup>: i farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) e i corticosteroidi che combattono il processo infiammatorio ma non le cause che lo scatenano; i farmaci biologici, effettori del danno, che limitano l'evoluzione invalidante della malattia aumentando però il rischio di infezioni e l'insorgenza di sindromi lupus-simili, oltre ad avere un costo molto elevato, e i DMARD's (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) che inibiscono le cellule patogene del sistema immunitario agendo su meccanismi di attivazione e proliferazione dei linfociti a monte dell'infiammazione tramite azioni di tipo immunomodulatorio od immunosoppressivo.

## I FANS

Come abbiamo già detto, i FANS non alterano in nessun modo il decorso della malattia ne tantomeno prevenendo la comparsa dei danni a livello delle articolazioni. È per questo motivo che non possono costituire il solo trattamento farmacologico <sup>27</sup>. Il loro utilizzo allevia il dolore sintomatico ed il gonfiore tipico delle malattie articolari. Sono anche chiamati farmaci tipo aspirina, perché mostrano azioni farmacologiche molto simili a quelle dell'aspirina; presentano infatti un effetto anti-infiammatorio, un effetto analgesico (riducono alcuni tipi di dolore, soprattutto quelli di origine infiammatoria) ed infine un effetto antipiretico. Mostrano però anche degli effetti collaterali tra cui irritazione della mucosa gastrica, effetti sul flusso sanguigno renale nei reni compromessi e mostrano una certa tendenza ad aumentare il tempo di coagulazione tramite l'inibizione dell'attività piastrinica. Ci sono ovviamente delle differenze fra i vari FANS in commercio, ma tutti

questi effetti sono la conseguenza dell'azione inibitoria di questi farmaci nei confronti delle ciclo ossigenasi COX-1 e COX-2. In particolare la COX-2 viene indotta dall'IL-1 e del TNF- $\alpha$  nelle cellule infiammatorie dopo la loro attivazione, ed è ritenuta responsabile della produzione di prostanoidei mediatori dell'infiammazione. L'azione anti-infiammatoria dei FANS è quindi strettamente legata all'azione inibitoria nei confronti di COX-2, mentre gli effetti indesiderati probabilmente son dovuti all'inibizione delle COX-1. Negli anni sono quindi stati messi a punto dei farmaci che inibissero selettivamente COX-2, al fine di ridurre le componenti dell'infiammazione e della risposta immunitaria quali vasodilatazione, edema e dolore dovuti all'azione di questa ciclo-ossigenasi, tuttavia si è scoperto che questi portano ad un aumento del rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari. I FANS inibiscono il dolore, il gonfiore e l'aumento del flusso sanguigno associato all'infiammazione con conseguente riduzione della rigidità mattutina che affligge i pazienti affetti da artrite reumatoide, ma non hanno praticamente alcun effetto sulla progressione della malattia cronica alla base di questi fenomeni <sup>2</sup>.

## I CORTICOSTEROIDI

Esiste una categoria di farmaci che viene utilizzata per il trattamento dell'artrite reumatoide a causa della loro azione immunosoppressiva. La maggior parte di questi farmaci risulta efficace quando viene utilizzata nella fase induttiva della risposta immunitaria attraverso la riduzione della proliferazione dei linfociti. Altri farmaci invece, come i corticosteroidi, sono in grado di inibire anche certi aspetti della fase effettrice. Si tratta di un gruppo di ormoni che vengono prodotti dalla corteccia delle ghiandole surrenali, e appartengono alla classe degli steroidi. Possono essere suddivisi in due grandi categorie: i glucocorticoidi ed i mineralcorticoidi. Vengono utilizzati per le loro proprietà anti-infiammatorie ed immunosoppressive e per i loro effetti sul metabolismo. I mineralcorticoidi regolano il bilancio dell'acqua e degli elettroliti, mentre i glucocorticoidi influenzano il metabolismo di carboidrati e di proteine ed esercitano una potente azione regolatoria nell'immunità innata ed in quella acquisita. Sono stati sviluppati degli steroidi sintetici, che hanno permesso di separare le azioni mineralcorticoidi da quelle glucocorticoidi. Tuttavia, non è ancora stato possibile separare le azioni anti-infiammatorie di questi ultimi da quelle metaboliche. I glucocorticoidi sono i farmaci anti-infiammatori per eccellenza, e quando vengono somministrati a dosi terapeutiche hanno potenti effetti

anti-infiammatori ed immunosoppressori. Sono in grado di inibire sia le manifestazioni precoci dell'inflammation ( il calore, il dolore e il gonfiore) ma anche gli stadi successivi che portano alla guarigione ed alla riparazione, nonché le reazioni proliferative che si osservano nell'inflammation cronica. Gli effetti sulle cellule infiammatorie comprendono una diminuzione dell'attività delle cellule T helper ed una ridotta proliferazione clonale delle cellule T tramite una minor produzione di IL-2 e del suo recettore; si nota anche una diminuzione nella funzionalità dei fibroblasti che diminuiscono la riparazione e la guarigione oltre che il loro contributo nell'inflammation cronica. I glucocorticoidi, sia nella fase di induzione sia nella fase effettrice della risposta immunitaria, possono diminuire la trascrizione di geni per l'espressione di alcune citochine (TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  e l'IL-1) inibendo l'azione dei fattori di trascrizione come AP-1 ed NF-kB. Infine si può notare una ridotta funzionalità degli osteoblasti a discapito di una maggiore attività degli osteoclasti con conseguente tendenza a sviluppare osteoporosi. Gli effetti indesiderati si manifestano più spesso quando vengono somministrate dosi elevate del farmaco e quando il trattamento deve essere effettuato per lunghi periodi. Per questo, quando è necessario un uso prolungato dei glucocorticoidi per via sistemica, viene consigliata una terapia a giorni alterni che può diminuire gli effetti indesiderati <sup>2</sup>.

## FARMACI BIOLOGICI

Negli ultimi anni è stato sviluppato un nuovo gruppo di farmaci, i biologici, con i quali è possibile limitare l'evoluzione invalidante della malattia <sup>28</sup>. Sono definiti biologici perché si tratta di molecole biotecnologiche (anticorpi ingegnerizzati) ottenute con la tecnica del DNA ricombinante ed altre proteine <sup>2</sup>. Possono essere definiti anche farmaci anti-citochine, proprio perché le citochine sono il loro obiettivo primario, anche se possono avere come bersaglio anche cellule B e molecole co-stimolatorie <sup>29</sup>. Questi farmaci inibiscono citochine infiammatorie quali TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 che abbondano nei pazienti con artrite reumatoide. Con l'utilizzo di questi farmaci si ha generalmente un rapido miglioramento dei sintomi della malattia, dovuti quasi sempre alla presenza di infiammazione <sup>30</sup>. Sono però molto difficili da produrre e molto costosi, di conseguenza il loro uso è ristretto ai pazienti che non rispondono adeguatamente a tutte le altre terapie. I farmaci attualmente disponibili si dividono in molecole che legano il TNF inibendone gli effetti (Infliximab, adalimumab, etanercept) antagonisti dell'IL-1 (anakinra ) od anticorpi monoclonali contro

la catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2 (basiliximab, daclizumab). Questi farmaci sono quindi molto selettivi nella loro azione, tuttavia questo non li rende immuni dal provocare gravi danni collaterali. Possono infatti aumentare il rischio di infezioni, di incidenze tumorali, di complicanze neurologiche e persino di sindromi lupus-simili<sup>30</sup>.

## I DMARD's - Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs

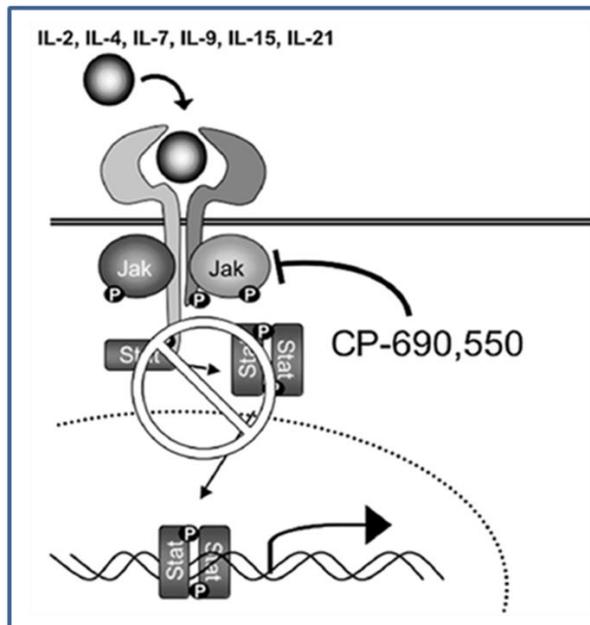
Sono considerati come farmaci di seconda linea nella cura dell'artrite reumatoide da utilizzare quando altri farmaci, come i FANS, hanno fallito. I DMARDs hanno un'attività piuttosto lenta, possono volerci dei mesi perché inizino a fare effetto, per cui in questa fase di induzione si somministrano dei FANS, e solo se la terapia ha successo, la concomitante terapia con FANS-gluccorticoidi viene cessata. Nell'artrite reumatoide i DMARDs migliorano i sintomi e sono in grado di ridurre l'attività della malattia, infatti si riscontra un ridotto numero di articolazioni rigonfie, attenuazione del dolore, minor disabilità, un miglioramento dell'indice radiologico articolare e una diminuzione della concentrazione plasmatica delle proteine della fase acuta e del fattore reumatoide. Dei DMARDs fanno parte diversi farmaci con strutture chimiche e meccanismi d'azione differenti: il metotrexate, sulfasalazina, penicillamina, i composti dell'oro e la cloroquina. Negli ultimi anni inoltre è stato sviluppato il primo inibitore delle JAK chinasi, chiamato Tofacitinib.

## TOFACITINIB

Negli ultimi 10 anni ci si è resi conto dell'importanza di conoscere nel dettaglio le *pathway* di trasduzione del segnale che controllano l'espressione genica di citochine e chemochine così come dei geni che controllano l'espressione delle proteine di adesione. In questo periodo si è scoperto che l'attivazione della *pathway* JAK/STAT (Janus Kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription) era largamente responsabile del mantenimento dell'infiammazione nell'artrite reumatoide a causa della sovra-regolazione delle citochine pro-infiammatorie dovuta ad una sovra-regolazione di JAK3<sup>31,32</sup>.

Nella via di segnalazione di JAK/STAT, il recettore viene attivato dal segnale della citochina che vi si lega e questo promuove l'autofosforilazione di JAK. A questo punto STAT si lega al recettore fosforilato e trasloca nel nucleo dove si lega al promotore del DNA promuovendo la trascrizione dei geni coinvolti nella crescita e nel differenziamento cellulare.

Il Tofacitinib è un DMARD's di nuova generazione, una piccola molecola ancora sotto



**Figura 11. Meccanismo d'azione di Tofacitinib**  
(immagine tratta da Lippincott William&Wilkins Curr Opin Rheumatology,2005)

studio a causa della sua azione inibitoria nei confronti delle chinasi JAK (Figura 11). Viene anche chiamato CP-690,550 o Xeljanz e viene utilizzato nel trattamento delle malattie autoimmuni per il ruolo che ricopre nel blocco dell'attivazione linfocitaria<sup>33</sup>. In particolare la tirosin chinasi JAK3 sembra essere implicata nel *signaling* di diverse citochine, incluse IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ed IL-21, tutte intimamente coinvolte nell'attività delle cellule T, B e Natural Killer, e nella proliferazione delle cellule della risposta immunitaria<sup>31,34</sup>. Tofacitinib provoca una diminuzione dell'infiammazione a causa

della sua capacità di sopprimere il *signaling* mediato dall'IL-17, sopprime la produzione di IFN- $\gamma$  e riduce la sregolata proliferazione di cellule T CD4<sup>+</sup> nelle sinovie infiammate dell'artrite reumatoide, oltre a sopprimere l'attivazione della via canonica JAK/STAT<sup>32,35</sup>. È stato spesso utilizzato in associazione con il Metotrexate<sup>36</sup>. È stato raccomandato un dosaggio di 5mg di Tofacitinib da somministrare oralmente. Il più comune effetto indesiderato è lo sviluppo di infezioni<sup>37,38</sup>, anche se è stato riscontrato in alcuni pazienti anche un aumento dei livelli di creatinina, e una diminuzione nella conta dei neutrofili<sup>31</sup>.

Il Tofacitinib è un farmaco che ha ricevuto l'approvazione dell'FDA americana nel Novembre del 2012 come farmaco di seconda linea per il trattamento dell'artrite reumatoide a seguito del fallimento di uno o più DMARDs. Per questa stessa indicazione tuttavia, in Europa è stato respinto per ben due volte. Infatti, il CHMP (Committee for Medicinal products for Human Use) ha espresso parere negativo, il 25 aprile 2013,

riguardo l'uso di Xeljanz nel trattamento di pazienti adulti affetti da forme moderate o gravi di artrite reumatoide, convinti che non vi sia sufficiente vantaggio dal punto di vista del rapporto rischio/beneficio nell'uso del farmaco. Il CHMP è d'accordo nel confermare che vi è un miglioramento di segni e sintomi e nelle funzioni fisiche dei pazienti ma non crede che ci sia una consistente riduzione nell'attività della malattia e nei danni strutturali alle articolazioni, soprattutto se rapportati all'insorgenza di gravi infezioni, perforazioni intestinali e tumori osservati durante l'utilizzo del farmaco. La società Pfizer, produttrice del farmaco, ha richiesto però un riesame del farmaco alla commissione del CHMP, che il 25 luglio 2013 ha confermato il rifiuto all'autorizzazione al mercato di Xeljanz<sup>39</sup>.

Le ultime linee guida americane (2015) sul trattamento dell'artrite reumatoide confermano il potenziale utilizzo di questo farmaco (a discrezione di medico e paziente) sottolineando però la mancanza di dati nel lungo periodo, visto che si tratta di un farmaco molto giovane

<sup>40</sup>.

## SCOPO DELLA TESI

Sul farmaco Tofacitinib si sa ancora relativamente poco essendo un farmaco di nuova generazione. Ciò che sappiamo è che data la sua attività inibitoria nei confronti di JAK/STAT, meccanismo che controlla la crescita ed il differenziamento cellulare, è intimamente coinvolto nel *signaling* di diverse citochine importantissime per il differenziamento, l'attivazione e la proliferazione cellulare. Abbiamo deciso di soffermarci a studiare le possibilità che questo farmaco può offrire nel regolare il trattamento delle malattie reumatiche valutando la sua attività nei confronti di un particolare *lineage* di cellule, le T regolatorie. Questa idea è stata sviluppata dopo aver visto lo studio della dott.ssa Battaglia su un altro farmaco, la Rapamicina, che era stato utilizzato per espandere selettivamente la popolazione di cellule Tregolatorie CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> <sup>41</sup>. In questo caso la Rapamicina, un farmaco immunosoppressore utilizzato per prevenire il rigetto nei trapianti d'organo e come copertura degli stent per prevenire la restenosi, è stato studiato per l'effetto che poteva avere sulle cellule T regolatorie data la sua azione inibitoria nella produzione e nell'attività dell'IL-2. La Rapamicina era in grado di agire su mTOR (mammalian target of rapamicyn) la cui attivazione è richiesta per la sintesi proteica e la progressione del ciclo cellulare. È stato dimostrato infatti che questo farmaco blocca la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S dopo l'attivazione e che promuove l'anergia delle cellule T indotta da TCR anche in presenza di co-stimolazioni. A livello delle cellule T regolatorie ciò che hanno visto è che una lunga esposizione al farmaco promuove l'espansione delle cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> che mantengono la loro capacità soppressiva sia *in vivo* che *in vitro*. È molto importante soprattutto considerare la possibilità che la Rapamicina non agisca direttamente sulle cellule T regolatorie: infatti è molto probabile che il *signaling* dell'IL-2R, che viene inibito tramite l'azione del farmaco su mTOR, serva a differenziare le cellule T effettrici, e che quindi l'espansione selettiva delle T regolatorie sia solo una conseguenza di questa inibizione, dato che queste cellule possono usare una *pathway* differente per esprimersi: la *pathway* JAK/STAT5 <sup>41</sup>.

Nel 2014, il gruppo di ricerca con cui ho lavorato per portare a compimento gli esperimenti richiesti per la stesura di questa tesi, ha pubblicato un interessante articolo proprio sull'azione del tofacitinib sul destino dei linfociti. Ciò che hanno notato infatti, era che nel periodo in cui il farmaco veniva somministrato ai linfociti in coltura la loro proliferazione

veniva inibita, e questo veniva confermato con la riduzione dell'espressione del marker di attivazione (CD25) in tutti i linfociti, ma in particolare sui linfociti T. Al contrario, una volta rimosso il farmaco, hanno visto un recupero della proliferazione linfocitaria, soprattutto nelle cellule che erano state trattate con la dose di farmaco più alta (100µM), e questo accadeva parallelamente ad un aumento dei marker di attivazione. È stata notata anche una diminuzione nel rilascio di citochine quali IL-2, IL-9, IL-10, IL-13 e TNF-α quando le cellule si trovavano in coltura con il farmaco, mentre quando il farmaco veniva rimosso le cellule precedentemente trattate col Tofacitinib hanno mostrato un aumento nella secrezione di IL-2, TNF-α e IL-13, in modo particolarmente evidente nelle cellule trattate con la dose massima di farmaco<sup>33</sup>.

Partendo da questi presupposti, abbiamo deciso di valutare la possibilità che il Tofacitinib potesse permetterci di “riprogrammare” i linfociti, se sottoposti ai corretti stimoli, nei diversi profili cellulari in cui una cellula CD4 naive può differenziarsi. Infatti, la diminuzione del rilascio di determinate citochine durante il trattamento e la ripresa di solo alcune di queste a seguito della rimozione del farmaco<sup>33</sup> ha fatto supporre che le cellule fossero più indirizzate ad un fenotipo naive, e quindi potessero essere suscettibili al reindirizzamento se correttamente stimolate. Basandoci su questo, e su quanto era stato fatto con la Rapamicina, abbiamo valutato la possibilità di indurre una maggiore produzione di cellule Tregolatorie rispetto agli altri lineage cellulari.

Abbiamo quindi provato a sviluppare un modello in vitro che ci permettesse di studiare l'azione del Tofacitinib su questi linfociti regolatori al fine di valutare la risposta delle cellule sottoposte a trattamento per lunghi periodi e a concentrazioni di farmaco diverse. A questo modello abbiamo voluto inoltre affiancare uno studio sulla metilazione delle regioni TSDR di FOXP3 che ci permettesse di identificare in modo certo la percentuale di cellule Tregolatorie presenti, ed il loro andamento, durante i vari *step* dell'esperimento.

# MATERIALI E METODI

## Piano Sperimentale

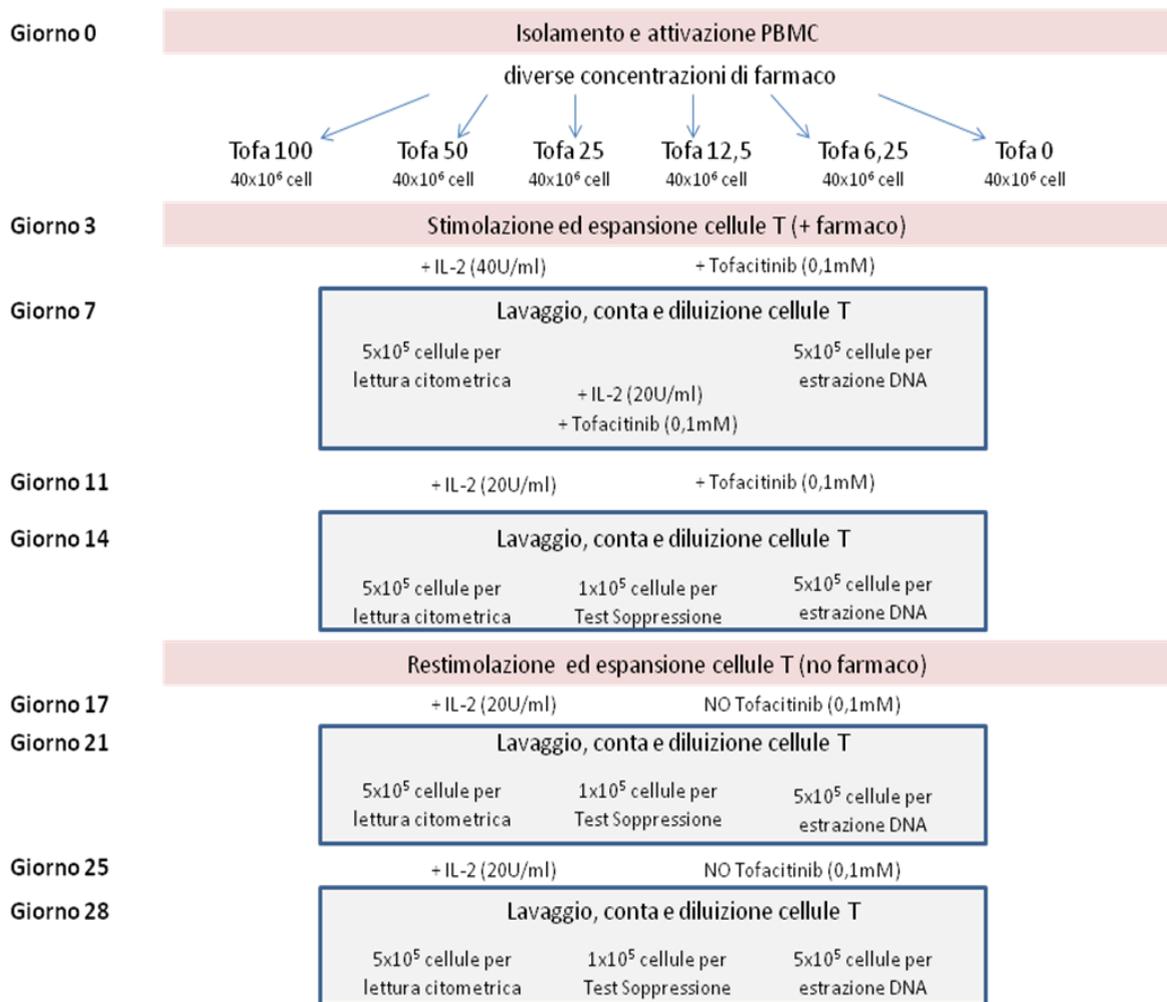
I PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ottenuti dai Buffy Coat sono stati mantenuti in coltura per un totale di 28 giorni. In breve al giorno 0 i PBMC ottenuti dalla separazione mediante centrifugazione su gradiente di densità sono stati contati, ed è stato seguito il protocollo di attivazione delle cellule T. Le cellule attivate sono state quindi divise in 6 gruppi, con uguale numero di cellule, a cui è stato dato il farmaco Tofacitinib a diverse concentrazioni. Dopo 72 ore di coltura (giorno 3), ogni sospensione cellulare è stata aliquotata in due parti uguali, e ad ognuna è stato aggiunto terreno fresco di coltura con IL-2 40 U/ml, e Tofacitinib alla rispettiva concentrazione. Dopo ulteriori 4 giorni di coltura (giorno 7) le cellule sono state lavate con soluzione fisiologica centrifugando 300xg per 10 minuti per eliminare lo stimolo. Sono state contate e sono state poste nuovamente in coltura in presenza del farmaco, in terreno completo, con IL-2 20 U/ml. Rimaste in coltura altre 72 ore (giorno 11) sono state divise come al giorno 3, ed è stato aggiunto terreno fresco con IL-2 20 U/ml e farmaco alla corretta concentrazione. Dopo essere state mantenute in coltura per altri 4 giorni (giorno 14) sono state lavate e centrifugate per eliminare ogni traccia di farmaco e di stimolo e quindi contate. Sono state quindi restimolate con le biglie di attivazione e messe nuovamente in coltura in presenza di IL-2 20 U/ml, ma senza farmaco. Il giorno 17 è stato aggiunto terreno fresco. Le cellule sono state lasciate in coltura fino al giorno 21, in cui sono state lavate, contate e poste nuovamente in coltura in terreno privo di IL-2 e di farmaco. Il giorno 25 sono state suddivise in due aliquote ed è stato aggiunto terreno fresco con IL-2 20 U/ml. Le cellule sono state infine lasciate in coltura per ulteriori 3 giorni (giorno 28).

In tutti gli esperimenti le cellule sono state risospese alla densità di  $2,5 \times 10^6$  cellule/ml in terreno di coltura X-VIVO 15 (Lonza) addizionato con 5% human serum AB (Sigma Aldrich), penicillina/streptomina 100 U/ml e L-glutamina 200mM (entrambi Euroclone). Alla coltura viene aggiunto, dove necessario, lo stimolo costituito da Interleuchina 2 (IL-2, Euroclone). Per i primi 14 giorni viene aggiunto il farmaco Tofacitinib (Sigma Aldrich), in diluizioni scalari: 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 12,5 $\mu$ M, 6,25 $\mu$ M e 0  $\mu$ M (ovvero senza farmaco). Le cellule sono state mantenute in coltura in incubatore a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) per 28 giorni.

Al giorno 7, giorno 14, giorno 21 e giorno 28,  $5 \times 10^5$  cellule sono state analizzate al citofluorimetro per valutarne l'attivazione e la percentuale di cellule regolatorie presenti.

Contemporaneamente, negli stessi giorni,  $5 \times 10^5$  cellule sono state conservate a  $-80^\circ\text{C}$  per la successiva estrazione di DNA.

Nei giorni 14 e 21, inoltre,  $1 \times 10^5$  cellule sono state utilizzate per il test di soppressione

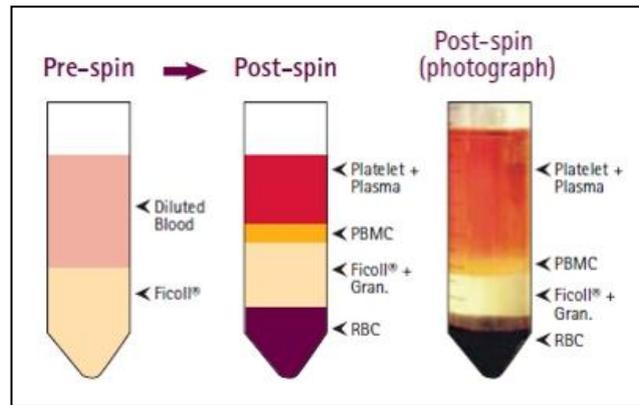


**Figura 12: Schema del piano sperimentale**

### Isolamento PBMCs

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati i PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) di donatori sani estratti da Buffy Coat, preparati dal servizio di Medicina Trasfusionale dell'Ospedale Maggiore di Trieste.

I PBMCs sono stati ottenuti tramite separazione mediante centrifugazione su gradiente di densità (Figura 13); il sangue, diluito 1:3 con soluzione fisiologica, viene stratificato delicatamente su un polimero sintetico a densità nota ( $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ )



(Lympholyte, Cederline) e centrifugato 500xg per 30 minuti a temperatura

**Figura 13. Separazione mediante centrifugazione su gradiente di intensità**

ambiente (RT) senza decelerazione. Si ottiene in questo modo la stratificazione del sangue, in cui si vede in modo chiaro l'anello di PBMCs, che può essere aspirato con una pipetta pasteur e trasferito in una provetta per essere lavato 2 volte con soluzione salina (300xg, 10minuti, RT).

I PBMC ottenuti sono stati risospesi in Buffer Miltenyi composto da Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, addizionato con 0,5% human serum AB e 2mM EDTA pH 8. Sono stati poi contati al microscopio ottico utilizzando la cameretta di Burker, escludendo le cellule morte grazie alla colorazione col trypan blue.

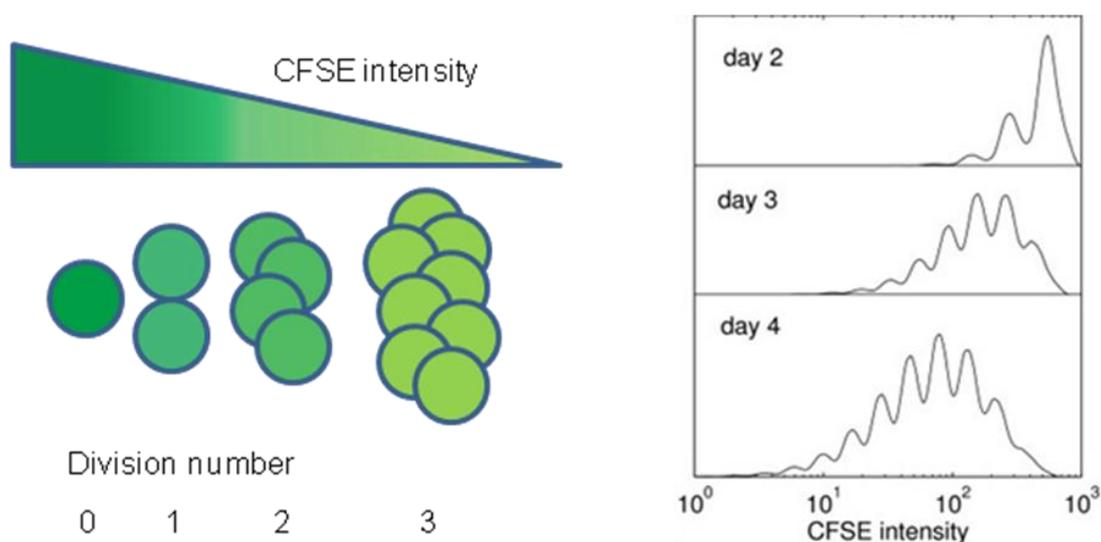
### Attivazione cellule T

Le biglie Anti-Biotin MACSiBead Particles (T cell activation/Expansion kit, human, Miltenyi Biotec) sono state caricate con gli anticorpi biotinilati CD2-Biotin, human (100 $\mu\text{g/ml}$ ), CD3-Biotin, human (100 $\mu\text{g/ml}$ ) e CD28-Biotin, human (100 $\mu\text{g/ml}$ ). Il protocollo di caricamento prevede il legame di gruppi di  $1 \times 10^8$  anti-Biotin MACSiBead Particles con 100 $\mu\text{l}$  di CD2-Biotin, 100 $\mu\text{l}$  di CD3-Biotin e 100 $\mu\text{l}$  di CD28-Biotin, per ottenere la massima attivazione di cellule T. A seguito del caricamento, le biglie devono essere incubate per 2 ore a 2-8°C sotto costante, gentile rotazione, a velocità minima. L'attivazione ottimale di cellule T si ottiene utilizzando una loaded Anti-Biotin MACSiBead Particle ogni due cellule (rapporto biglia-cellula 1:2).

## Test di Soppressione

La capacità di soppressione dell'attivazione di cellule target da parte delle cellule in coltura con diverse concentrazioni di Tofacitinib è stata valutata per mezzo di un test funzionale che misura in modo indiretto l'attività soppressiva.

Per questo test, al giorno 14 e al giorno 21,  $1 \times 10^5$  cellule per ogni punto trattato col farmaco sono state aliquotate e messe in co-cultura con  $1 \times 10^5$  cellule target precedentemente marcate con il tracciante CellTrace™ CFSE (CFDA-SE, Oregon Green 488 Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, per brevità CFSE -Life Technologies). L'estere diacetato succinimidico della carboxifluoresceina (CFDA-SE) diffonde facilmente dentro le cellule grazie ai suoi gruppi acetati, che perde una volta entrato nel citoplasma a causa di esterasi citoplasmatiche endogene che lo convertono nell'estere fluorescente, CFSE ( $E_{x_{max}}$  492 nm,  $E_{m_{max}}$  517 nm). Quest'ultimo viene trattenuto all'interno delle cellule tramite legame covalente tra il suo gruppo succinimidico e proteine intracellulari. Questo permette di visualizzare fino a 7 divisioni cellulari (8 picchi di fluorescenza) poiché questo colorante è in grado di distribuirsi equamente nelle cellule figlie ad ogni divisione cellulare, diminuendo la sua concentrazione e la sua intensità in modo proporzionale al numero di divisioni a cui le cellule vanno incontro (Figura 14).



**Figura 14. Schema esemplificativo della diminuzione della fluorescenza per ogni divisione cellulare**

Le cellule target sono state ottenute da sangue periferico eparinato di donatore. I PBMCs sono stati lavati e poi risospesi  $1 \times 10^6$  cell/ml in X-VIVO 15 addizionato con 10% Albumina (Albital 200g/L, Kedrion), penicillina/streptomicina 100U/ml e L-glutammina 200mM (entrambi Euroclone). Alle cellule è stato aggiunto il tracciante alla concentrazione finale di  $40 \mu\text{M}$  e sono state incubate al buio a  $37^\circ\text{C}$ , per 5 minuti, per permettere alle esterasi di modificare la molecola di CFSE. Le cellule sono state quindi lavate due volte con X-VIVO addizionato con albumina 10% per eliminare il colorante in eccesso (300xg, 7 minuti, RT). Infine le cellule sono state risospese in X-VIVO (addizionato con 5% human serum AB e penicillina/streptomicina con L-glutammina), e aliquotate ( $1 \times 10^5$  cellule) per altrettante cellule di ogni punto trattato col farmaco. È stato aggiunto lo stimolo, cioè le stesse biglie utilizzate per l'attivazione iniziale, ad ogni gruppo di  $2 \times 10^5$  cellule (rapporto biglie/cellule 1:2). Sono state quindi lasciate in incubatore a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  al buio per 4 giorni.

## Analisi del fenotipo delle cellule T regolatorie

Ogni 7 giorni (giorno 7, giorno 14, giorno 21 e giorno 28)  $5 \times 10^5$  cellule sono state trattate per l'analisi al citofluorimetro del fenotipo delle cellule T regolatorie. In breve, le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali anti-CD4 APC (Miltenyi Biotec), anti-CD25 APC-Cy7 (Biolegend) e anti-CD127 PE-Cy5 (eBioscience). Le cellule sono state incubate per 20 minuti, a temperatura ambiente ed al buio, e sono state poi lavate con *Cell Staining Solution* (PBS w/o CaMg addizionato a 0,1% Na azide e 1% BSA) e centrifugate 300xg, 5minuti. Per la marcatura intracellulare di FoxP3, è stato utilizzato il kit commerciale Alexa Fluor® 488 anti-mouse/rat/human FOXP3 Flow Kit (Biolegend). Seguendo le istruzioni del fornitore, le cellule sono state lavate con i tamponi di fissazione e permeabilizzazione. Successivamente le cellule sono state marcate con l'anticorpo anti-FoxP3 Alexa Fluor 488 o con il rispettivo controllo isotipico, Mouse anti-Human IgG1 Alexa Fluor 488. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente ed al buio, le cellule sono state lavate con *Cell Staining Solution* ed infine analizzate al citofluorimetro.

## Citometria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnologia che permette di misurare simultaneamente diverse caratteristiche fisiche delle cellule quando attraversano, in un mezzo fluido, un

raggio laser incidente. Le proprietà misurate sono la dimensione relativa, la complessità interna e la fluorescenza dovuta alla marcatura con sostanze fluorescenti. Queste caratteristiche sono determinate usando un sistema ottico-elettronico accoppiato che registra come le cellule deviano il raggio laser incidente ed emettono fluorescenza. La deviazione della luce e la fluorescenza vengono quindi convertite in impulsi elettronici che vengono poi processati dal computer.

Ogni cellula che passa attraverso la luce incidente viene registrata come un evento ed ogni evento presenta quindi caratteristiche e parametri basati sulla deviazione della luce e sulla fluorescenza. La deviazione del raggio luminoso detto scatter dipende dalla dimensione della cellula e dalla complessità interna. Esistono due tipi di scatter, il *forward scattered light* (FSC) che è proporzionale alle dimensioni della cellula e il *side scattered light* (SSC) che è invece proporzionale alla granulosità o alla complessità interna della cellula. Le cellule possono anche essere marcate artificialmente per mezzo di fluorocromi. Quando questi assorbono energia luminosa questo eccesso di energia viene rilasciato come emissione di fluorescenza, e l'intensità del segnale fluorescente rilasciato (MFI) sarà proporzionale al numero di molecole fluorocrome sulla particella.

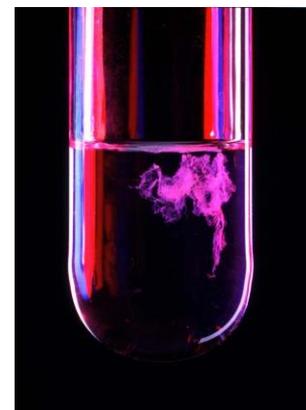
La differenza di lunghezza d'onda di assorbimento e di emissione dei diversi fluorocromi consente l'utilizzo di più molecole (anticorpi monoclonali) coniugate a diversi fluorocromi contemporaneamente e quindi è possibile identificare le singole cellule analizzate con il citofluorimetro in base ai marcatori antigenici di superficie riconosciuti dall'anticorpo. In una popolazione cellulare mista i differenti fluorocromi possono essere usati contemporaneamente per identificare diverse popolazioni e sottopopolazioni cellulari. Nell'utilizzo del citometro vengono presi determinati accorgimenti che permettono di acquisire ed interpretare meglio i dati ottenuti. Si possono infatti scegliere criteri e soglie per l'acquisizione dei dati e fissare i valori di amplificazione del segnale e la soglia che deve essere superata per trasformare il segnale in evento. Generalmente si usa prestabilire il numero di eventi da acquisire. Altro accorgimento adottato per stringere l'analisi ad una specifica popolazione all'interno di un campione è l'utilizzo di delimitatori (gate) numerici o grafici che definiscano le caratteristiche di scatter o di fluorescenza delle particelle da includere.

Per tutte le acquisizioni descritte nel presente lavoro è stato utilizzato un citometro Dako Cytomation (Beckman Coulter) mentre per la analisi di post-acquisizione è stato utilizzato il software FlowJo 7.6.5.

## Saggio di metilazione del locus TSDR (Treg-specific demethylated region)

Per valutare le metilazione del locus TSDR (Treg-specific demethylated region), ad ogni time-point (giorno 7, giorno 14, giorno 21 e giorno 28),  $5 \times 10^5$  cellule sono state lavate con PBS w/o CaMg e centrifugate 300xg per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato completamente eliminato ed il pellet di cellule residuo è stato conservato a  $-80^\circ\text{C}$  fino al momento dell'estrazione di DNA.

La tecnica utilizzata per estrarre il DNA è quella del *Salting Out* che prevede la lisi delle cellule tramite un tampone di lisi ed il trattamento con Proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali. Infine mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA. La precipitazione delle proteine mediante *salting out* sfrutta il principio secondo cui la solubilità delle proteine in soluzione dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione salina. Ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente causando la precipitazione delle stesse. Per estrarre il DNA, il pellet di cellule che è stato conservato a  $-80^\circ\text{C}$ , è stato innanzitutto lavato con il tampone di lisi composto da TRIS 1M, EDTA 0,5M, NaCl 1M (Sigma Aldrich), a cui sono stati aggiunti Proteinasi K 20mg/ml (Qiagen) e SDS 20% (Sodio Dodecil Solfato, Sigma Aldrich). I campioni sono stati incubati in bagnetto a  $65^\circ\text{C}$  per 10 minuti ed infine le proteine in sospensione sono state fatte precipitare con NaCl saturo 6M, centrifugando a 3000xg, 15minuti a temperatura ambiente. E' stato recuperato il surnatante, a cui è stato aggiunto 1 ml di Etanolo assoluto (EtOH 100%) freddo. Agitando con forza la provetta è possibile a questo punto vedere ad occhio nudo la cosiddetta medusa di DNA (figura 15), che può essere recuperata per essere lavata in EtOH 70%.



**Figura 15** . Esempio di medusa di DNA

Centrifugando, è stato possibile eliminare il surnatante e il pellet contenente il DNA è stato lasciato quindi ad asciugare per eliminare ogni residuo di etanolo per evaporazione. La provetta contenente il pellet è stata quindi lasciata una notte a +4°C, per la successiva quantificazione del DNA estratto.

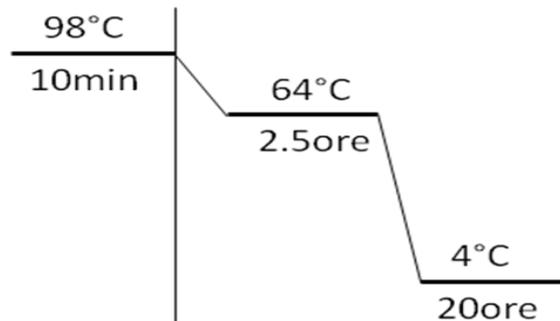


Il DNA estratto è stato quantificato e ne è stata valutata la purezza per mezzo della lettura allo spettrofotometro (Nanodrop 1000 V3.7.0, Thermo Scientific). Un microlitro di campione viene appoggiato sull'estremità di un cavo a fibre ottiche (*receiving fiber*) mentre un secondo cavo a fibre ottiche (*source fiber*) viene

portato a contatto col campione liquido facendo sì che il liquido colmi la distanza tra le due fibre. Una lampada *flash* a luce pulsata allo xeno fornisce la sorgente di luce che viene analizzata da uno spettrofotometro dopo che questa ha attraversato il campione. Lo strumento viene controllato da un software ed i dati registrati sul PC.

La concentrazione del DNA si ricava dall'Assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda di massimo assorbimento per gli acidi nucleici) utilizzando la legge di Lambert-Beer, mentre la purezza del DNA si ricava dai rapporti tra le assorbanze a 260, 280 e 230 nm.

Ogni campione di DNA deve essere a questo punto sottoposto a un trattamento che permette la conversione delle citosine non metilate in uracile. Questo processo è stato effettuato utilizzando il kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research). Per avere risultati ottimali, il kit prevede che vengano utilizzati fino a 500 ng di DNA per ottenere una buona conversione delle citosine non metilate utilizzando il trattamento con il bisolfito e la seguente amplificazione tramite PCR. Tuttavia, ci siamo resi conto che per i nostri campioni la quantità di DNA di partenza doveva essere maggiore per ottenere una buona resa, ed abbiamo quindi deciso di utilizzare 800 ng di DNA di partenza per ogni campione. Il protocollo è stato poi seguito senza ulteriori modifiche. In breve è stato aggiunto al DNA il reagente che consente la conversione delle citosine, ed ogni campione è stato quindi inserito nel termociclatore (uno strumento che permette di incubare la miscela a una serie di temperature che variano in maniera programmata) nel quale sono avvenute sia la denaturazione del DNA sia la conversione tramite bisolfito. I campioni sono stati quindi lasciati ad incubare a +4°C per 20 ore.



Il giorno seguente il DNA è stato inserito all'interno di una colonnina contenente una soluzione che lega il DNA metilato ed è stato centrifugato a 12000xg per 1 minuto. L'eluato è stato eliminato, è stato effettuato un lavaggio, seguito da centrifuga, ed è stata aggiunta una soluzione di desulfonazione che viene lasciata a contatto coi campioni per 20 minuti a temperatura ambiente. Sono stati poi fatti un paio di lavaggi con la soluzione appropriata, infine è stata aggiunta direttamente sulla matrice della colonnina una soluzione di eluizione che ha permesso al campione di eluire nella provetta sottostante una volta sottoposto a centrifuga a 12000xg per 2 minuti.

Secondo questo protocollo può essere recuperato più del 75% del DNA di partenza, e per esserne sicuri, abbiamo sottoposto nuovamente ogni campione a quantificazione utilizzando lo spettrofotometro GeneQuant Pro (Amersham Bioscience). Considerato però che il DNA si trova a singolo filamento e contiene l'uracile, lo misuriamo in qualità di RNA. Questo tipo di spettrofotometro non ci dà direttamente la concentrazione, ma ci fornisce solo i valori di Assorbanza e del rapporto 260/280. Per effettuare le letture abbiamo diluito i nostri campioni di 300 volte (abbiamo messo 2 µl di campione in 580 µl di acqua) e ricordando il fattore di correzione ci siamo ricavati la concentrazione di ogni singolo campione.



$$\text{Fattore di Correzione RNA} \times \text{Assorbanza} \times \text{Diluizione}$$

In seguito, abbiamo deciso di effettuare una PRE-PCR per aumentare la quantità di DNA di partenza. La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) infatti permette l'amplificazione selettiva di una regione selezionata di una molecola di DNA. Per poterla attuare bisogna

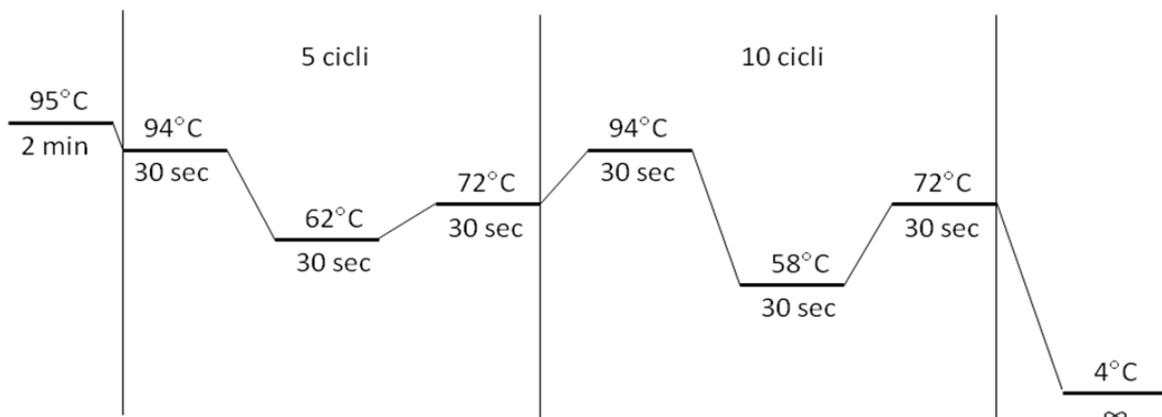
conoscere le sequenze che si trovano ai confini della regione stessa, in modo tale da poter utilizzare due brevi oligonucleotidi (i cosiddetti primer) che delimitano la regione che verrà amplificata ibridando ognuno un filamento della doppia elica. Questa amplificazione avviene per merito di un'enzima, la Taq DNA polimerasi, che è la DNA polimerasi I del batterio *Thermus Aquaticus*, organismo che vive in sorgenti idrotermali bollenti. Questa Taq DNA polimerasi è termostabile, cioè resiste alla denaturazione dovuta a trattamento al calore, dettaglio importantissimo che ci permette di utilizzarla nelle PCR dove, per consentire la denaturazione del DNA, la temperatura viene fatta salire fino a 94°C. Di norma poi la temperatura viene fatta scendere intorno ai 50-60°C per permettere l'unione dei primer a posizione specifiche delle molecole di DNA (processo che viene definito ibridazione o *annealing*). A questo punto la temperatura viene nuovamente innalzata per permettere alla Taq polimerasi di funzionare, legandosi ad un'estremità di ciascun primer e sintetizzando nuovi filamenti di DNA, complementari alle molecole di DNA stampo. Questi tre passaggi di denaturazione, annealing e sintesi vengono ripetuti per circa 25-30 cicli, con i quali si ottengono più di 50 milioni di copie del frammento di interesse.

Noi ci siamo limitati ad effettuare una PRE-PCR, ovvero sia abbiamo utilizzato un numero minore di cicli di amplificazione, che anticipano la reazione vera e propria effettuata con la REAL-TIME PCR. Innanzitutto abbiamo portato ogni campione alla concentrazione di 20 ng/μl. Sono stati utilizzati 100ng di DNA che sono stati inseriti in una miscela contenente buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, i due primer, *forward* e *reverse*, e la Taq polimerasi. Il buffer viene utilizzato per mantenere il pH stabile rendendo quindi l'ambiente adatto alla reazione, il MgCl<sub>2</sub> è indispensabile per il corretto funzionamento della DNA polimerasi, mentre i dNTPs , ovvero i nucleotidi liberi, servono per la costruzione dei nuovi filamenti.

Buffer 5x	4 μl
MgCl <sub>2</sub> 7,5mM a 1,5mM	1,2 μl
dNTPs 10mM a 0,25mM	0,5 μl
Primer Forward 20μM a 750nM	0,75 μl
Primer Reverse 20μM a 750nM	0,75 μl

GoTaq Hot Start Polimerase 1U (Promega)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O per arrivare ad un V <sub>2</sub> di 15 $\mu$ l	7,6 $\mu$ l

La PRE-PCR effettuata è di tipo *Touchdown*, che ci permette di aumentare la specificità della reazione di PCR utilizzando due diverse temperature di ibridazione. In questo modo, mantenendo una temperatura di ibridazione più alta nei primi cicli di PCR (5 cicli), riusciamo ad ottenere una stringenza maggiore che scoraggia la formazione di aspecifici, consentendo alla sequenza desiderata di predominare. La prima temperatura utilizzata è di 2-6°C in più rispetto alla Temperatura di Fusione ( $T_m$ ) consigliata per l'appaiamento dei primer. Terminati i primi 5 cicli, il termociclatore viene programmato per effettuare 10 cicli identici ai precedenti, tranne per quanto riguarda la temperatura di ibridazione, che facciamo scendere ad una temperatura meno stringente rispetto alla precedente, che ci consente di aumentare la quantità della sequenza desiderata. Il tempo di ibridazione viene mantenuto a 30 secondi in entrambi i passaggi di ibridazione, per non favorire appaiamenti a stampi a bassa complementarità, cosa che accadrebbe se permettessimo l'ibridazione per tempi più lunghi.



I campioni sono stati lasciati overnight a riposare a +4°C ed il giorno successivo è stata effettuata la REAL-TIME PCR.

I primer utilizzati per la PRE-PCR e la REAL TIME PCR sono gli stessi :

Primer Forward GAA ATT TGT GGG GTG GGG TAT TTG TTT T

Primer Reverse ATC TAC ATC TAA ACC CTA TTA TCA CAA CCC CC

## Real Time PCR

Si tratta di una PCR quantitativa, che riesce ad associare l'amplificazione e la quantificazione del prodotto di PCR in un'unica reazione, misurando l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, fase in cui l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione. Utilizza sonde di ibridazione specifiche marcate con molecole fluorescenti, le sonde TaqMan. Si tratta di oligonucleotidi che vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare in modo tale da ibridarsi all'interno della sequenza amplificata dai due primers. Le molecole fluorescenti con cui vengono marcate sono definite *Reporter* e *Quencher*. Il *reporter* è un fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza e si lega all'estremità 5' della sonda, mentre il *quencher* è un fluorocromo a bassa energia che si lega all'estremità 3' della sonda e che spegne la fluorescenza del *reporter* quando si trovano vicini, assorbendone i fotoni. Durante la fase di estensione la polimerasi, che sta sintetizzando sul DNA templato il secondo filamento a partire da un primer, incontra l'estremità 5' della sonda, che nel frattempo si è legata alla sua sequenza bersaglio sul DNA templato. Quando incontra la sonda, la fa staccare dal templato per la lunghezza di alcuni nucleotidi e la taglia (Figura 15). Così facendo il *reporter* viene allontanato dal fluorocromo che ne blocca la fluorescenza e può quindi emettere segnale che verrà quindi captato dallo strumento. L'intensità di fluorescenza sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di amplificato specifico all'interno della reazione.

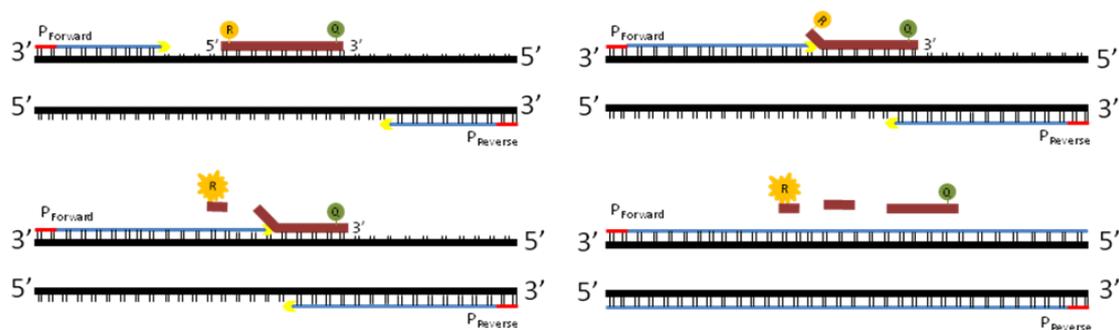


Figura 15. Schema esplicativo sul funzionamento delle sonde TaqMan durante l'amplificazione del templato.

Per eseguire la Real Time PCR è stata utilizzata la TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystem) contenente la AmpErase® Uracil-N-Glicosidasi (UNG), un enzima che previene contaminazioni dei prodotti di PCR dovuti ad eventuali Uracili incorporati nei filamenti doppi o singoli di DNA. Inoltre la MasterMix contiene l'AmpliTaq Gold DNA polimerasi, i dNTPs con il dUTP e i tamponi per ottimizzare le reazioni dei diversi componenti. Sono state preparate due diverse miscele contenenti entrambe la MasterMix, i primer, l'acqua per arrivare al volume di reazione, 1µl del DNA amplificato con la PRE-PCR, e una sonda per soluzione.

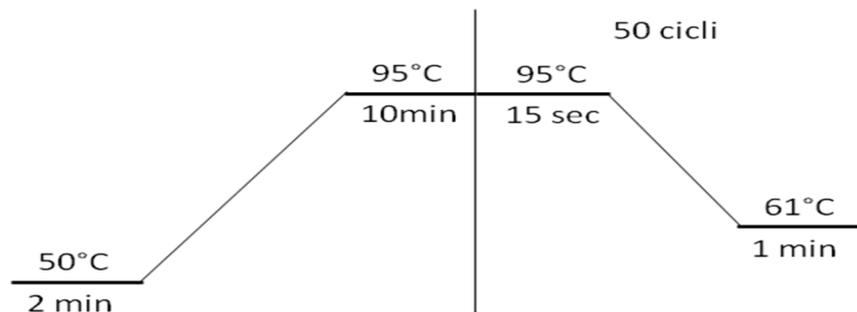
MasterMix (Applied Biosystem)	10 µl	MasterMix (Applied Biosystem)	10 µl
Primer Forward 20 µM a 750 nM	0,75 µl	Primer Forward 20 µM a 750 nM	0,75 µl
Primer Reverse 20 µM a 750 nM	0,75 µl	Primer Reverse 20 µM a 750 nM	0,75 µl
Sonda Met 10 µM a 250 nM	0,5 µl	Sonda Umet 10 µM a 250 nM	0,5 µl
Campione DNA post-PRE PCR	1 µl	Campione DNA post-PRE PCR	1 µl
Acqua	7 µl	Acqua	7 µl

Non sono state messe entrambe le sonde nella stessa soluzione per via delle molecole *reporter* con cui sono state disegnate: la sonda che riconosce il DNA metilato (SONDA MET) è stata disegnata col fluorocromo FAM (6-carbossifluoresceina, assorbe a 485nm ed emette a 515nm) mentre la sonda che identifica il DNA non metilato (SONDA UMET) è stata disegnata con il fluorocromo VIC®(assorbe a 488nm ed emette a 552nm). Entrambe hanno come *quencher* la molecola MGB (Minor Groove Binder). Per leggere al meglio le due fluorescenze con lo strumento ABI 7500 (Applied Biosystem) abbiamo deciso di non inserire le due sonde nella stessa miscela di reazione.

Sonda Met      FAM TCG GCG TAT TCG G MGB

Sonda U-Met      VIC AGT TTG GTG TAT TTG GT MGB

Lo strumento ABI 7500 è formato da un termociclatore equipaggiato con un rilevatore a fluorescenza che permette l'acquisizione della fluorescenza emessa dalle sonde che legano il DNA. Per il nostro esperimento il termociclatore è stato impostato in modo tale da attivare nei primi due minuti l'enzima UNG in modo da eliminare le possibili contaminazioni, dopodiché la temperatura viene innalzata a 95°C per consentire l'attivazione della Taq Polimerasi e la denaturazione dei filamenti di DNA. Da questa temperatura poi partono dei brevi cicli (50 in tutto) nei quali avviene l'amplificazione dei frammenti di DNA con la lettura della fluorescenza.



Il sistema viene tarato in modo da definire una soglia (threshold) dove i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Questa soglia è fondamentale per definire il Ct (ciclo soglia) relativo ai diversi campioni. Durante la reazione di Real Time PCR ogni campione viene visualizzato come una curva esponenziale che sale per i primi cicli e poi normalmente arriva a *plateau* (a causa di una graduale inattivazione termica della polimerasi e di un progressiva riduzione nell'efficienza di ibridazione). Il Ct che viene fornito dalla macchina relativo ad ogni campione è il punto in cui la curva relativa a quel campione interseca la linea di soglia. Ogni campione avrà il suo specifico Ct, e tanto più alto è questo valore, tanto minore è la quantità

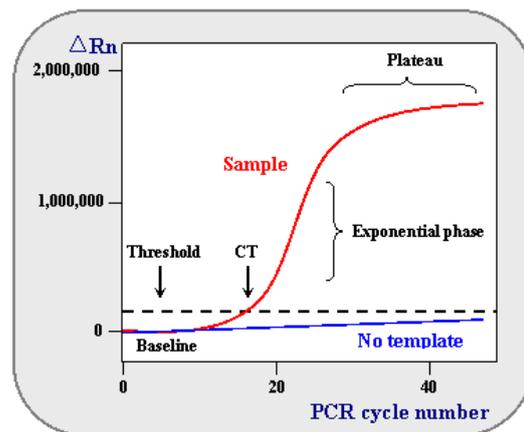


Figura 16. Modello grafico di una Real-Time PCR quantitativa <sup>1</sup>

iniziale di campione. Durante i cicli di amplificazione il sistema rileva le fluorescenze emesse dalle sonde Met e Umet, e di conseguenza ci informa sulla quantità di DNA metilato e di DNA non metilato presente, esprimendola in Ct. Per poter definire in

percentuale la quantità di DNA metilato e di DNA non metilato presente nei nostri campioni, conoscendo il Ct, dobbiamo calcolarci il  $\Delta Ct$  di ogni campione

$$\Delta Ct = Ct_{Umet} - Ct_{Met}$$

Dal quale poi ci ricaviamo  $2^{\Delta Ct}$ , per cui possiamo ricavarci la quantità di DNA metilato (e di conseguenza di DNA non metilato) utilizzando la seguente formula:

$$2^{\Delta Ct} / 2^{\Delta Ct} + 1$$

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### ESPERIMENTI PRELIMINARI

I primi esperimenti fatti riguardavano la possibilità di poter riprogrammare il *lineage* delle cellule T regolatorie partendo da PMBCs utilizzando il farmaco Tofacitinib. Abbiamo valutato questa possibilità analizzando i marcatori di superficie che queste cellule esprimevano dopo 3-4 giorni dall'induzione dei *lineage* (indotti tramite l'inserimento di apposite citochine) e attraverso l'analisi delle citochine extracellulari che si trovavano nel terreno di coltura (appendice pag II). Le analisi al citometro mostrano le differenze dal giorno 6 al giorno 7 (cioè prima e dopo l'inserimento dello stimolo fitoemoagglutinina (PHA). Ciò che notiamo subito è come tutte le cellule, indifferentemente dal *lineage* indotto, rispondano bene all'attivazione mostrando alti livelli di CD134 e di CD25. Il marcatore CD127 invece, che diventa specifico per le cellule Tregolatorie quando è a bassi livelli, mostra una diminuzione proprio nelle cellule TCD4 naive che erano state indotte a fenotipo regolatorio (appendice pag III). L'analisi delle percentuali riguardanti la quantità di cellule vive nei diversi sottogruppi indotti, mostra la presenza di una minima percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> in tutti i gruppi (intorno al 15%) (appendice pag IV). Delle citochine extracellulari analizzate nei terreni di coltura (appendice pag V), abbiamo trovato alti livelli di IL-4 proprio nel gruppo indirizzato verso il fenotipo Th2, e alti livelli di IFN- $\gamma$  nel gruppo indirizzato verso il fenotipo Th1. L'IL-6, che sappiamo essere decisiva *in vivo*, insieme al TGF- $\beta$ , per il differenziamento verso Th17 o Treg, è giustamente più bassa nelle cellule indotte ad essere Tregolatorie rispetto a quelle indotte ad essere Th17.

Abbiamo quindi fatto un'altra serie di esperimenti, dove abbiamo tralasciato l'induzione di Th1 e Th2 e ci siamo focalizzati esclusivamente sull'induzione di Th17 e di Treg (il cui rapporto sregolato le vede coinvolte nel decorso delle patologie reumatiche) dividendo però fin da subito le cellule in due gruppi distinti, uno a cui veniva sempre e solo aggiunta alle cellule la PHA ed un altro gruppo in cui oltre alla PHA veniva somministrato il farmaco, in modo da fare una verifica sull'effetto di quest'ultimo (appendice pag VI). Anche in questo caso abbiamo analizzato i marcatori cellulari negli ultimi due giorni di coltura cellulare. Ciò che si può notare (appendice pag VII) guardando la colonna indicante il CD134 (marker di attivazione) è come ci sia una differenza ben evidente tra le cellule stimulate con PHA e quelle stimulate PHA + Tofacitinib; si nota infatti una ripresa della proliferazione a seguito della rimozione del farmaco, a conferma di quanto visto

precedentemente da Piscianz et al <sup>33</sup>. Valutando la colonna in cui si vede come le cellule esprimono il CD25, marcatore di attivazione ed in minima parte marcatore di identificazione delle cellule Treg, vediamo come le cellule stimulate con PHA e Tofacitinib rispondano bene alla stimolazione, infatti vi è un aumento interessante dell'attivazione. La colonna indicante l'espressione del CD127 invece non ci ha dato chiare risposte perché è piuttosto basso in tutti i sottogruppi analizzati. Anche in questo gruppo di esperimenti abbiamo valutato la vitalità cellulare, sia per quanto riguarda la frazione CD4 di memoria che quella naive (appendice, pag VIII). Ciò che ci appare subito chiaro è che in generale le cellule sono meno vitali quando vengono trattate e sembra essere favorito un profilo di attivazione piuttosto che un profilo regolatorio sia nella frazione di cellule di memoria, sia in quella delle cellule naive, esattamente il contrario quindi di quanto ci saremmo aspettati. Inoltre vediamo come il trattamento con il farmaco ci permette di mantenere cellule CD4 naive anche dopo la stimolazione indipendentemente dal *lineage* che è stato indotto. Infine sono state valutate le citochine presenti nel surnatante al giorno 7, ultimo giorno di coltura delle cellule (appendice pag IX). L' IL-2 e IL-6, in particolar modo, ci confermano la ripresa della proliferazione una volta interrotto il farmaco, indipendentemente dal *lineage* che era stato indotto alle cellule quattro giorni prima.

Dati questi primi risultati, che ci fanno supporre che non sia possibile rieducare nel breve periodo le cellule ad esprimere un determinato *lineage*, come invece pensavamo dopo aver notato il silenzio citochinico nello studio precedente <sup>33</sup>, abbiamo fatto altri esperimenti preliminari per valutare gli effetti della somministrazione/rimozione del farmaco per un periodo più lungo (18 giorni) (appendice pag X). In questi esperimenti la vitalità delle cellule e la loro attivazione è stata valutata ai giorni 14 e 18, cioè prima e dopo l'ultima somministrazione di PHA e Tofacitinib (o solo PHA). Guardando i risultati relativi alla vitalità cellulare (appendice pag XI) vediamo come, in due settimane, viene favorita la quota di cellule CD4<sup>+</sup> rispetto alle cellule CD8<sup>+</sup>, e di queste, vediamo come la stimolazione con il farmaco mantenga comunque una buona percentuale di cellule di memoria rispetto alla componente naive, che è sempre presente, ma in quantità ridotta. Per quanto riguarda invece l'attivazione delle cellule abbiamo notato una vistosa differenza nella componente delle cellule CD4 di memoria quando vengono trattate solo con la PHA o con la PHA + tofacitinib: quando vengono trattate con il farmaco l'attivazione delle cellule di memoria si dimezza mentre la frazione delle cellule CD4 naive resta pressoché invariata (vedi

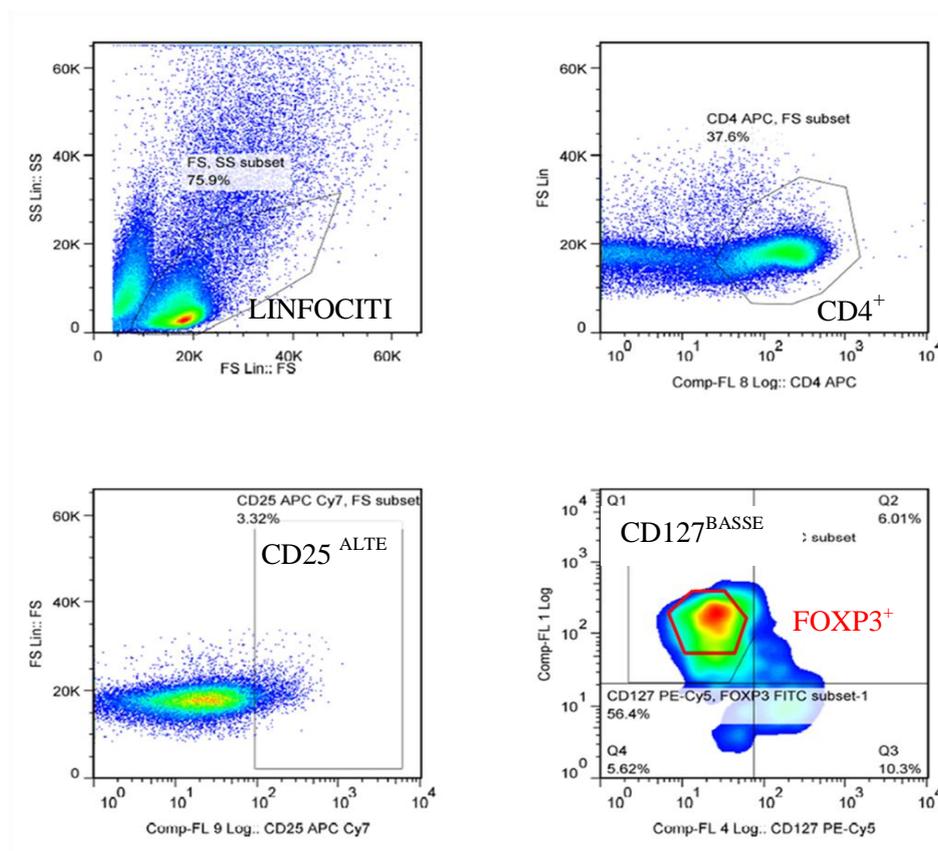
appendice pag XI). Possiamo quindi affermare che nonostante il trattamento a lungo termine, l'espressione del CD25 nelle cellule CD4 naive resta costante.

## ESPERIMENTI FINALI

Dopo questi risultati preliminari abbiamo deciso di mettere a punto un modello che ci permettesse di studiare l'azione del farmaco sui linfociti regolatori utilizzando come molecola stimolatrice l'IL-2 al posto della PHA. Le cellule sono state inizialmente sottoposte ad un protocollo di attivazione ed espansione con biglie caricate con gli anticorpi monoclonali CD2, CD3 e CD28 in modo da ottenere la massima attivazione delle cellule T. Dopo questa iniziale stimolazione, le cellule sono state mantenute in coltura con il farmaco per due settimane consecutive, mentre per le due successive settimane di coltura il farmaco è stato rimosso. Mettere a punto questo modello ha ovviamente richiesto un numero di cellule di partenza piuttosto elevato, ( $40 \times 10^6$  cellule) dato che quando le cellule sono sottoposte all'azione del farmaco vanno incontro ad un blocco proliferativo piuttosto ingente con conseguente diminuzione del numero di cellule totali. Ogni 7 giorni è stata fatta l'analisi fenotipica delle cellule utilizzando anticorpi di superficie utili ad identificare le cellule T  $CD4^+$  e di queste il sottogruppo regolatorio  $CD4^+ CD25^{\text{alto}} CD127^{\text{basso}}$ . Per valutare al meglio l'azione che il farmaco ha sulle cellule abbiamo deciso di stimolare, fin dall'inizio, differenti gruppi di cellule con differenti concentrazioni di farmaco. Pur sapendo che la dose consigliata in terapia non supera i 5-10mg di somministrazione<sup>36</sup>, abbiamo deciso di utilizzare anche dosi di farmaco ben al di sopra di questa soglia. È stata una scelta consapevole per valutare se a dosi elevate di farmaco gli effetti provocati alle cellule fossero maggiori o diversi rispetto a quelli provocati da quantità minori, ed in secondo luogo perché la quantità di  $100 \mu\text{M}$ , utilizzata come quantità massima di farmaco, era stata precedentemente utilizzata in uno studio permettendo di visualizzare fenomeni dati dal farmaco in maniera molto più visibile rispetto a quantità minori<sup>33</sup>.

Ciò che ci interessava vedere in particolar modo era se le cellule T regolatorie, con l'aiuto del farmaco Tofacitinib e dell' IL-2 riuscissero a prevalere su tutte le altre cellule. Sapendo che il farmaco provoca un blocco nella proliferazione cellulare<sup>33</sup> ci aspettavamo che dando alle cellule in coltura anche IL-2 le cellule T regolatorie, avide di questa citochina, si attivassero a sfavore degli altri gruppi di cellule. Nell'artrite reumatoide è lo squilibrio

che si crea nel controllo della reazione immunitaria a provocare uno stato infiammatorio continuo: se si riuscisse ad indurre una maggiore produzione di Tregolatorie, attive nel controllare e dirigere l'attivazione e l'inibizione delle altre cellule coinvolte in questi fenomeni, probabilmente si riuscirebbe a contrastare un poco l'avanzare di questa patologia. Ogni 7 giorni abbiamo quindi valutato il fenotipo delle cellule tenute in coltura con le diverse concentrazioni di farmaco ricercando la popolazione che avesse il fenotipo regolatorio. Sono state identificate in base all'espressione degli antigeni di membrana  $CD4^+$   $CD25^{alte}$   $CD127^{basse}$  ed all'espressione del fattore di trascrizione intracellulare  $foxP3^+$ . In particolare è stata prima identificata la popolazione dei linfociti e da questa è stata separata la popolazione  $CD4^+$ . Di quest'ultima popolazione è stata presa in considerazione la sola frazione di cellule  $CD25$  alte e di queste ultime quelle positive a  $FoxP3$  e che allo stesso tempo esprimessero bassi livelli di  $CD127$  (Figura 16). Di seguito è possibile vedere parte dei risultati ottenuti al citometro nei giorni 7, 14, 21,28 di uno degli esperimenti svolti (Figure 17 e 18).



**Figura 16. Identificazione tramite Citometria a flusso dei subset di popolazioni cellulari che sono utili all'identificazione delle cellule Tregolatorie  $CD4^+$   $CD25^{alte}$   $CD127^{basse}$   $FoxP3^+$**

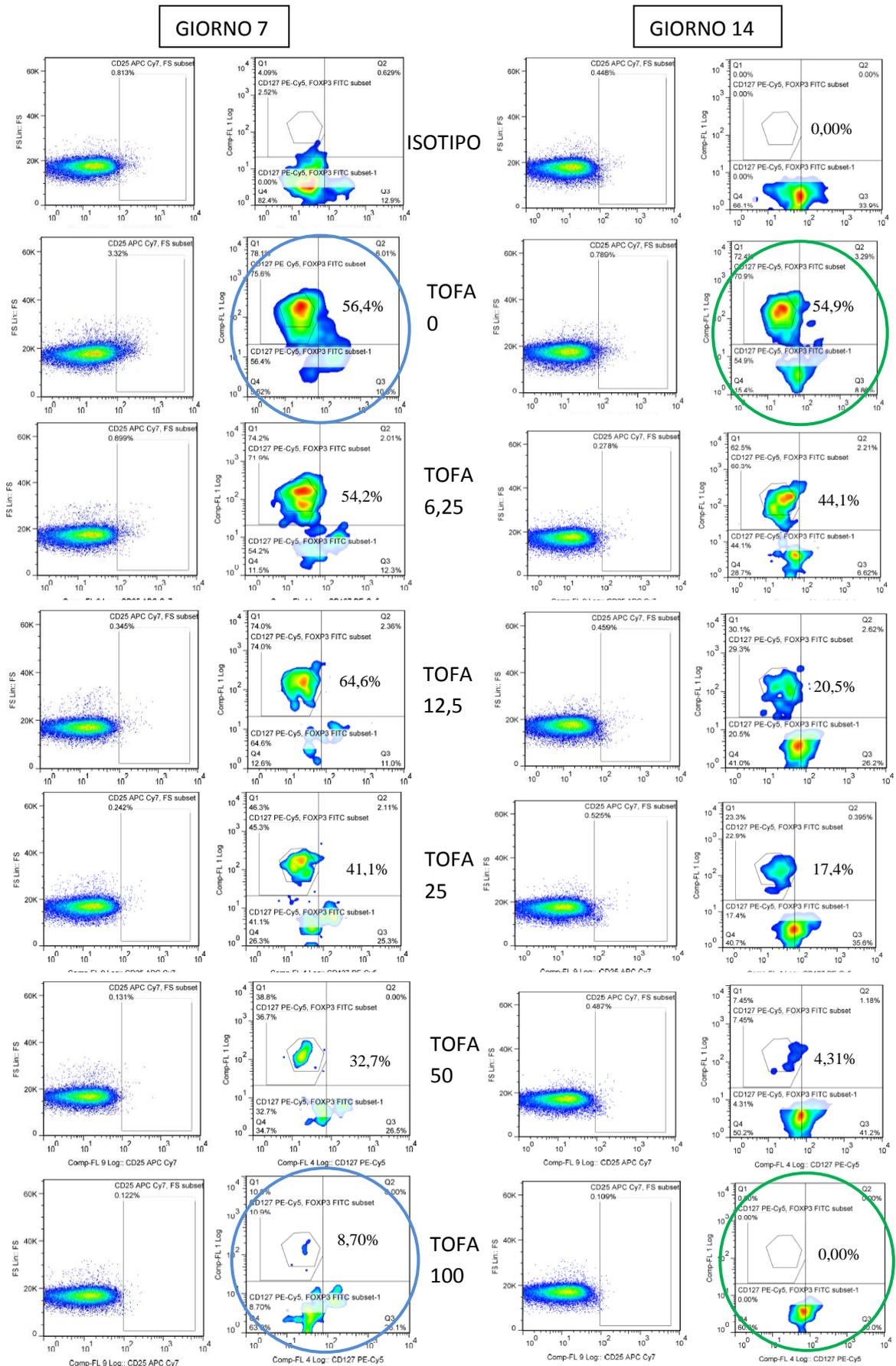


Figura 17. Visualizzazione di parte dei risultati ottenuti nelle giornate 7 e 14 di uno degli esperimenti.

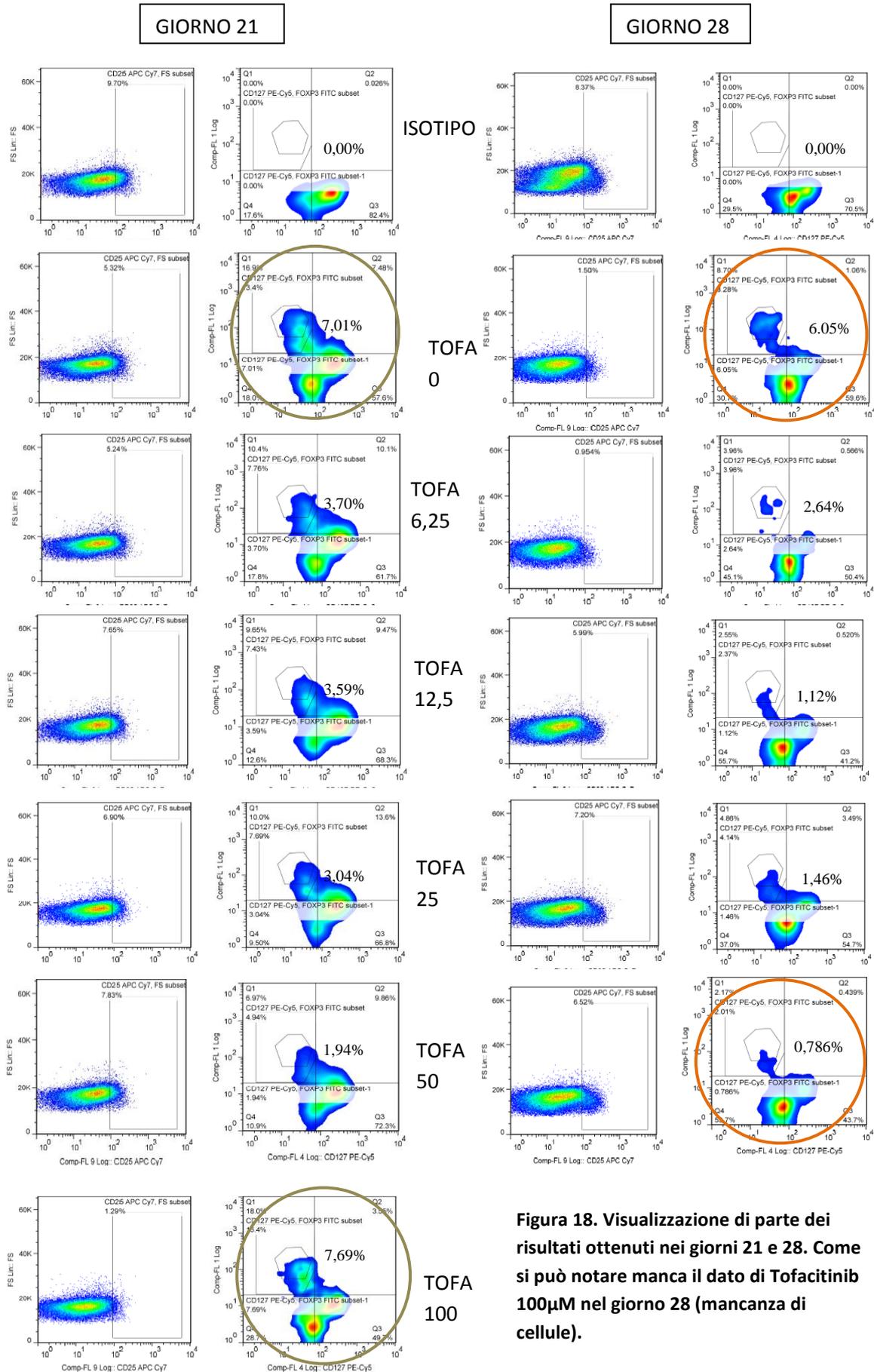
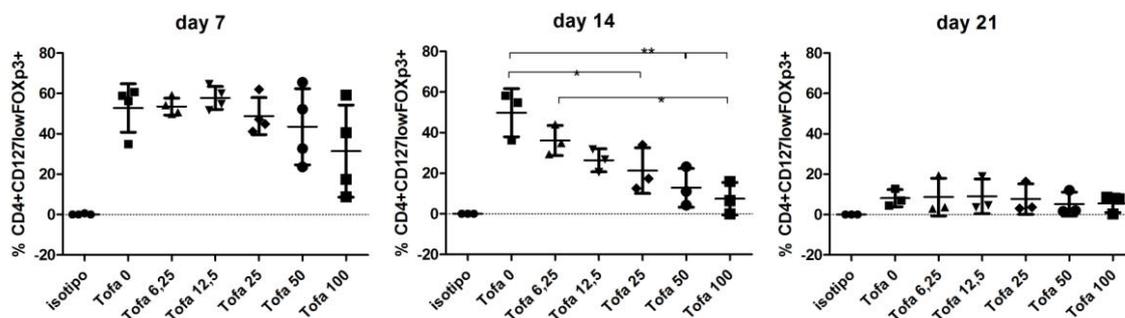


Figura 18. Visualizzazione di parte dei risultati ottenuti nei giorni 21 e 28. Come si può notare manca il dato di Tofacitinib 100µM nel giorno 28 (mancanza di cellule).

Ciò che si può facilmente notare guardando le percentuali relative alla quantità di cellule  $CD4^+ CD25^{alte} CD127^{basse} FoxP3^+$  è che nei primi 14 giorni (figura 17), cioè quando le cellule sono sottoposte al trattamento col farmaco nelle diverse quantità, vi è una grande differenza nella densità cellulare presente nei quadranti analizzati tra le cellule che non hanno ricevuto mai il farmaco (Tofa 0  $\mu M$ ) e le cellule che hanno ricevuto il farmaco alla quantità massima (Tofa 100  $\mu M$ ). Questo ci fa supporre che più alta è la quota di farmaco somministrata, più le cellule Tregolatorie vengono inibite. Abbiamo analizzato questo andamento anche nelle due settimane successive, nei giorni 21 e 28 (figura 18). In queste settimane le cellule hanno teoricamente avuto modo di riprendersi dalle diverse dosi di farmaco, dato che questo non gli è stato più somministrato, mentre la somministrazione di IL-2 è continuata. Ciò che si vede è che la differenza tanto marcata nelle prime due settimane tra le cellule che ricevono il farmaco e quelle che ricevono la dose massima si è assottigliata, ed anzi, sembra quasi che comincino a prevalere le cellule positive a FoxP3 nel gruppo Tofa 100. Questo dato sembrerebbe confermare i dati dello studio precedente riguardo la ripresa delle cellule dopo la rimozione del farmaco ma purtroppo non ci è stato possibile confermarlo anche al giorno 28 per mancanza di cellule nel gruppo Tofa100. Tuttavia se valutiamo il dato del gruppo Tofa 50 sembra che le cellule seguano lo stesso *trend* visto nella settimana precedente.

Su tutti i dati raccolti con la citometria a flusso è stata fatta l'analisi statistica (figura 19) per evidenziare eventuali differenze significative tra i diversi gruppi cellulari analizzati (tabelle in appendice pag XII), ed allo stesso tempo per valutare se ci fosse tanta dispersione dei dati tra un donatore e l'altro.

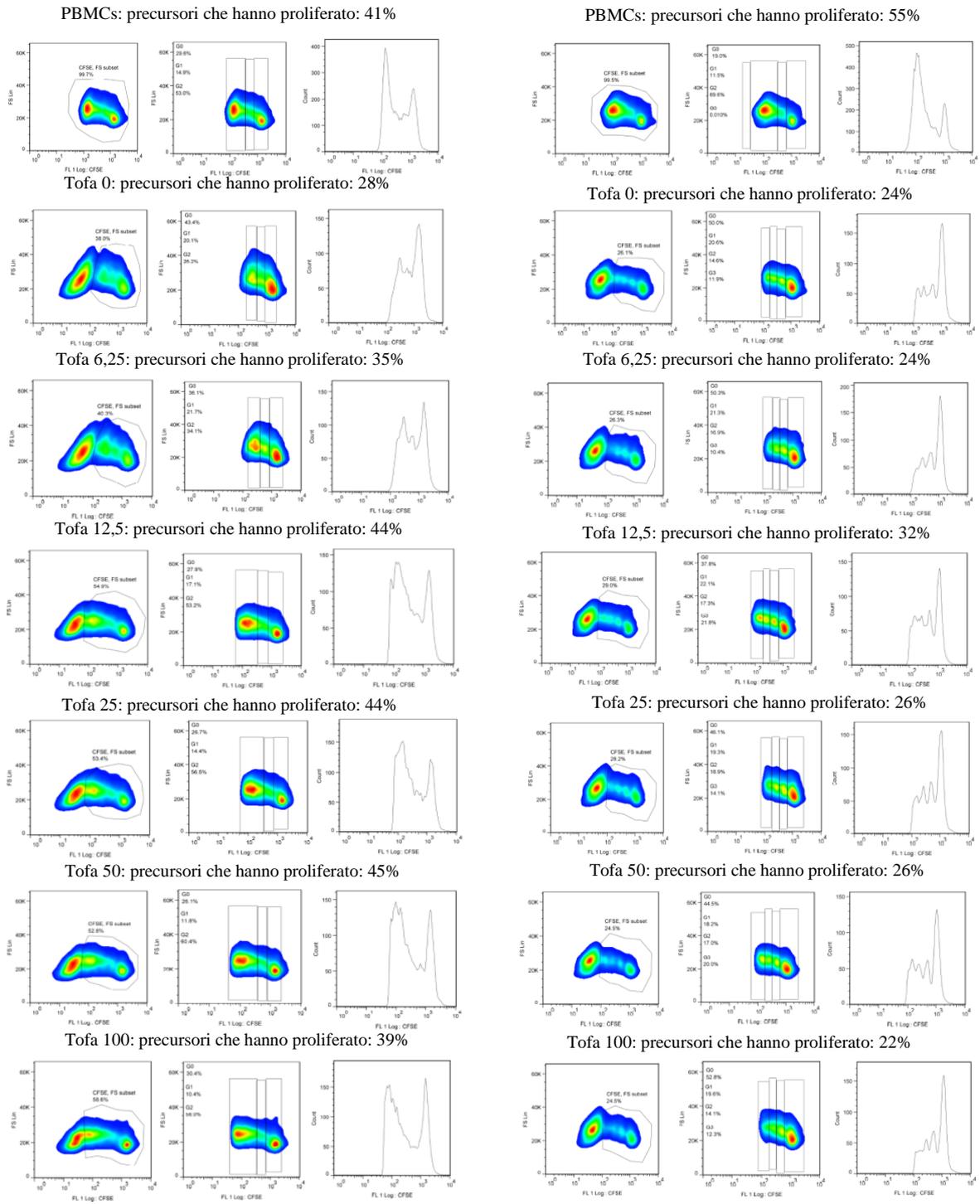


**Figura 19.** Analisi statistica dei dati raccolti tramite citometria a flusso ai giorni 7, 14 e 21 nei diversi gruppi cellulari.

Come è evidente, abbiamo tralasciato i dati relativi al giorno 28 poiché incompleti. Le uniche significatività riscontrate sono relative al giorno 14, quindi dopo due settimane di coltura cellulare con il tofacitinib. Per quanto riguarda il giorno 7 vediamo un'ampia dispersione dei dati, soprattutto nelle cellule che hanno ricevuto la dose massima di farmaco. Più aumenta la dose, più aumenta la dispersione dei dati nella prima settimana. Al giorno 21, al contrario, tutti i dati sono molto compatti, mostrando percentuali veramente basse in tutti i gruppi. I dati relativi al giorno 14 danno credito a quanto appare visivamente dai grafici precedenti delle letture al citometro relative alla densità cellulare nei diversi gruppi: ci sono grosse differenze tra le cellule a cui non è stato somministrato il farmaco e quelle che hanno ricevuto le dosi più alte, di 50  $\mu\text{M}$  e di 100 $\mu\text{M}$ . Ci sono anche nette differenze tra tofa 6,25 e tofa 100, così come tra tofa 0 e tofa 25. Ciò che emerge finora da questi dati non sembra assolutamente in linea con l'idea iniziale che le cellule Tregolatorie potessero prevalere rispetto alle altre. E' pur vero che si tratta di una classe di cellule che non ha mai percentuali troppo elevate rispetto alle altre cellule presenti nel sangue periferico di ogni individuo. Per capire meglio se quelle che vediamo in citometria con questa analisi fenotipica sono veramente cellule Tregolatorie attive, abbiamo deciso di effettuare anche un test che attesti la loro funzionalità, il cosiddetto test di soppressione. Le cellule T regolatorie infatti, per essere definite tali, devono possedere la capacità di sopprimere l'attivazione delle cellule T effettrici. Abbiamo quindi messo a punto questo test in cui le cellule in coltura vengono incubate insieme a delle cellule target (PBMCs da donatori terzi) marcate con un tracciante. In questo modo l'attività soppressiva delle cellule T regolatorie viene valutata indirettamente attraverso la riduzione della proliferazione delle cellule target: se le cellule T regolatorie sono funzionali infatti dovrebbero sopprimere la proliferazione delle cellule target in seguito ad uno stimolo recettoriale (che noi abbiamo indotto utilizzando le stesse biglie di attivazione usate precedentemente). Dopo 4 giorni di incubazione, in cui le cellule regolatorie hanno avuto il tempo di promuovere la loro capacità di soppressione sulle altre cellule, abbiamo eseguito il test (Figura 20).

Giorni 14/19

Giorni 21/26



**Figura 20: Test di soppressione per valutare in maniera indiretta l'attività soppressiva delle cellule Tregolatorie.**

Nel test di soppressione abbiamo valutato la proliferazione basandoci sul numero dei picchi e sull'intensità di fluorescenza del *Green Cell Trace*, il tracciante utilizzato sulle cellule. Il numero dei picchi a sinistra ci indica la quantità di volte che le cellule sono riuscite a proliferare, e questa proliferazione dovrebbe essere proporzionale alla diminuzione dell'intensità di fluorescenza. Sui test di soppressione effettuati al giorno 14 notiamo che all'aumentare della concentrazione del farmaco aumenta la proliferazione delle cellule, di conseguenza possiamo dedurre che c'è una minore soppressione da parte delle cellule T regolatorie. Questo dato ci ha confermato quanto visto con l'analisi fenotipica precedente, dove avevamo notato una riduzione nella densità delle cellule presenti nei quadranti analizzati. Probabilmente quindi la riduzione nella capacità soppressiva che vediamo con il test è indice della diminuzione del numero di cellule T regolatorie funzionali provocata dalla somministrazione di alti livelli di Tofacitinib. Nel test di soppressione eseguito al giorno 21, dopo una settimana di coltura cellulare senza farmaco, si può notare una maggiore soppressione in tutti i gruppi analizzati, senza particolari differenze dovute alla quantità di farmaco utilizzata. Ciò che vediamo quindi potrebbe non essere dovuto alla soppressione da parte delle cellule regolatorie, ma piuttosto ad una competizione fra le cellule T regolatorie e le cellule attivate, che senza l'inibizione data dal farmaco riescono a riprendersi. Come si vede piuttosto bene dai grafici, abbiamo identificato diverse popolazioni cellulari che sono relative ai diversi picchi di proliferazione. Abbiamo voluto indagare sulla quantità di cellule del gruppo iniziale che riuscisse a mantenere la capacità proliferativa, e abbiamo riportato questa percentuale sopra ogni singolo grafico. Queste percentuali sono tutte intorno al 40% per quanto riguarda il test di soppressione effettuato dopo due settimane di coltura, mentre questa percentuale cala un pochino (intorno al 30%) nel test effettuato la settimana successiva. L'andamento delle percentuali è però scostante, sembra che aumentino man mano che aumenta la concentrazione di farmaco somministrata alle cellule, tranne per quanto riguarda la dose più elevata, Tofa 100, in cui la percentuale cala, arrivando in entrambi i gruppi a eguagliare quasi quella presente nelle cellule trattate con Tofa 6,25. Questo potrebbe essere dovuto all'inibizione data alle cellule dal farmaco quando viene somministrato a dosi così elevate<sup>33</sup>.

Oltre a questi test citometrici che possono essere fatti per identificare le cellule T regolatorie, abbiamo voluto fare un test epigenetico che non lasciasse dubbi sulla natura delle cellule analizzate. Per questo motivo ogni 7 giorni abbiamo messo da parte la stessa

quantità di cellule da ogni gruppo, dalle quali abbiamo estratto il DNA per effettuare il test di metilazione relativo alle regioni TSDR di FOXP3. Come abbiamo già detto, le TSDR sono regioni altamente conservate che risultano demetilate esclusivamente nelle cellule Tregolatorie. Ci potrebbero infatti essere dubbi sull'identificazione di cellule FoxP3<sup>+</sup> dato che anche le cellule T effettrici recentemente attivate possono esprimere positività per questo fattore di trascrizione<sup>14</sup>. Con questo test epigenetico invece, riusciamo ad eliminare qualsivoglia dubbio sulla natura di queste cellule.

Ciò che si può notare fin da subito guardando le percentuali di demetilazione delle cellule in esame, è come queste siano tutte veramente molto basse (vedi tabella 3). Questi valori non ci devono spaventare considerando che fin dall'inizio della coltura abbiamo cercato di attivare esclusivamente i linfociti T rispetto a tutte le cellule presenti nel sangue. Di conseguenza sono stati attivati tutti i linfociti T, quindi è più che comprensibile che la percentuale delle cellule T regolatorie fra le cellule prelevate dalla coltura sia così esigua; dobbiamo infatti ricordarci che la quantità di cellule T regolatorie nel sangue di un essere umano sano è sempre piuttosto bassa (5-10%).

giorno / quantità farmaco	% Umet	giorno / quantità farmaco	% Umet	giorno / quantità farmaco	% Umet
day 7 tofa 100	0,24	day 7 tofa 100	1,19	day 7 tofa 100	1,08
day 7 tofa 50		day 7 tofa 50	0,84	day 7 tofa 50	2,15
day 7 tofa 25	1,27	day 7 tofa 25	0,19	day 7 tofa 25	1,80
day 7 tosa 12,5	0,81	day 7 tosa 12,5	0,58	day 7 tosa 12,5	0,65
day 7 tofa 6,25	0,83	day 7 tofa 6,25	0,54	day 7 tofa 6,25	1,16
day 7 tofa 0	2,85	day 7 tofa 0	0,63	day 7 tofa 0	2,80
day 14 tofa 100	0,26	day 14 tofa 100	0,65	day 14 tofa 100	1,62
day 14 tofa 50	1,21	day 14 tofa 50	0,52	day 14 tofa 50	0,82
day 14 tofa 25	0,87	day 14 tofa 25	0,67	day 14 tofa 25	1,07
day 14 tosa 12,5	1,03	day 14 tosa 12,5	0,30	day 14 tosa 12,5	0,92
day 14 tofa 6,25	1,39	day 14 tofa 6,25	1,43	day 14 tofa 6,25	1,05
day 14 tofa 0	0,85	day 14 tofa 0	1,59	day 14 tofa 0	2,48
day 21 tofa 12,5	0,43	day 21 tofa 100	0,38		
day 21 tofa 6,25	1,18	day 21 tofa 50	0,74		
day 21 tofa 0	2,70	day 21 tofa 6,25	0,43		
		day 21 tofa 0	1,01		

**Tabella 3: Valori di demetilazione delle regioni TSDR di FOXP3 delle cellule analizzate a seguito della somministrazione/rimozione del farmaco (per visualizzare le tabelle complete, vedi appendice pag XIII).**

Seppur molto bassi come valori, c'è una gran differenza tra le cellule che non hanno mai ricevuto il farmaco (Tofa 0) e le cellule che hanno ricevuto la dose massima (Tofa 100).

Infatti, sia durante la settimana in cui le cellule sono sottoposte al trattamento, sia nella settimana successiva, la quantità di cellule Tregolatorie presente nelle cellule che hanno avuto la dose massima di farmaco è di 2-3 volte inferiore rispetto alle cellule che non hanno ricevuto il Tofacitinib. Possiamo quindi affermare che le cellule evidenziate con i test citometrici sono in effetti cellule regolatorie, e che la loro funzionalità non diminuisce a causa dell'effetto del farmaco che ne inibisce l'attivazione, bensì ciò che diminuisce è proprio la quantità di cellule Tregolatorie presenti.

## CONCLUSIONE

Facciamo ora il punto della situazione su questo farmaco di nuova generazione di cui si sa ancora molto poco, anche se sono stati attivati numerosi studi di fase 2 e di fase 3 per valutare il suo utilizzo in terapia. L'azione del Tofacitinib sulle cellule T regolatorie, importantissime per la regolazione dell'immunità, finora non era ancora stata analizzata nel dettaglio. Ci siamo quindi proposti di dare uno sguardo più attento a questa categoria di cellule il cui studio è sempre complicato dato che la sola identificazione di queste ha creato negli anni numerose difficoltà ai diversi studiosi. Basandoci su studi precedenti sull'effetto di Tofacitinib nei confronti delle cellule T, abbiamo effettuato degli esperimenti preliminari per valutare se fosse possibile sfruttare l'azione inibitoria del farmaco sulle cellule, per indurre in queste un profilo regolatorio. Con questi esperimenti siamo però riusciti solamente a confermare ciò che era già stato visto in precedenza, cioè che la rimozione del farmaco, a seguito di un periodo di somministrazione, promuove l'attivazione delle cellule. Abbiamo quindi messo a punto un modello sperimentale per studiare queste cellule e l'azione che il farmaco ha su di loro, per lunghi periodi di coltura, utilizzando diverse quantità di farmaco. Ciò che è apparso subito chiaro è che per portare a termine l'esperimento erano necessarie grosse quantità di cellule, cosa che ha richiesto l'utilizzo di numerosi *buffy coat* da donatori. Tuttavia, pur partendo da elevate quantità, non siamo sempre riusciti ad arrivare fino all'ultimo giorno di coltura (il giorno 28) con cellule sufficienti ad effettuare tutte le analisi che ci eravamo preposti di eseguire, a causa dell'ingente blocco proliferativo causato da questo farmaco durante i giorni di somministrazione. Abbiamo inoltre voluto dividere le cellule in diversi gruppi a seconda della quantità di farmaco che andavamo a somministrare: questo ci ha permesso di ottenere anche dei dati relativi ad eventuali differenze riscontrate nell'utilizzo di dosi diverse di

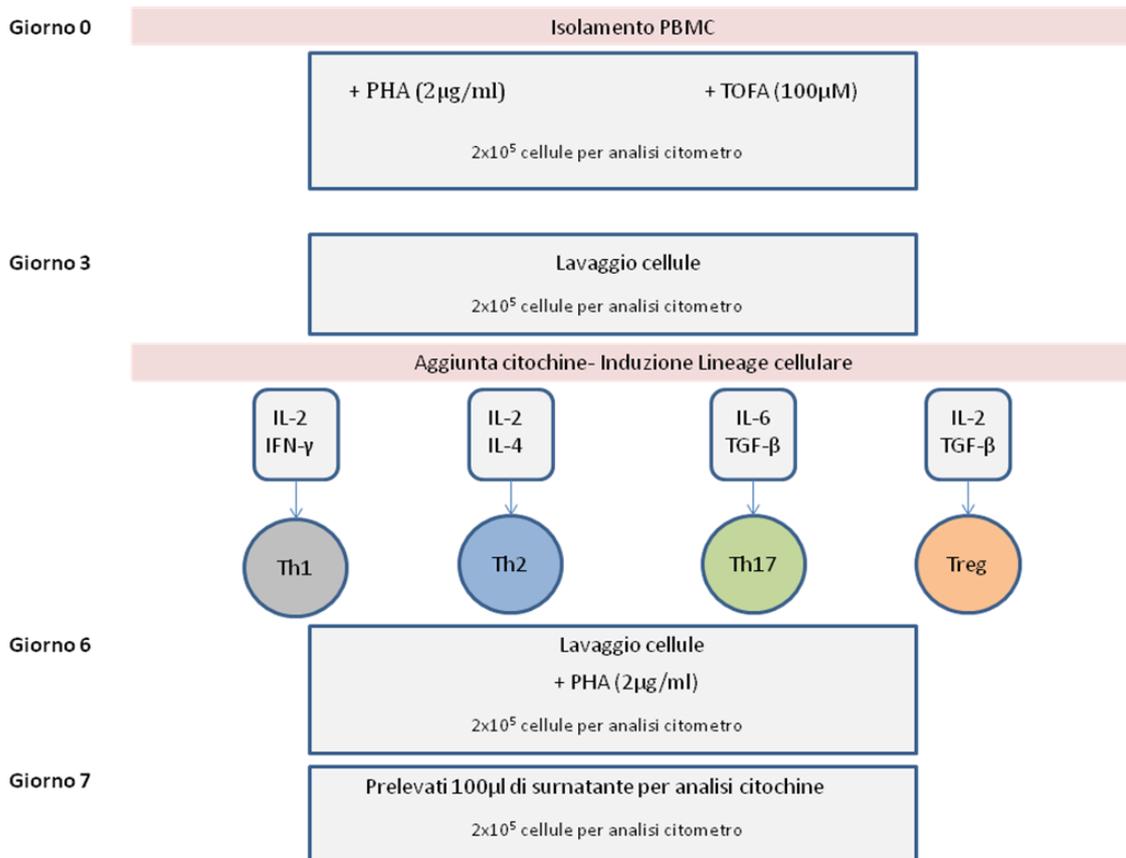
farmaco. La dose massima utilizzata infatti è ben al di sopra della dose consigliata in terapia: tuttavia è una quantità che finora ha permesso di evidenziare degli effetti altrimenti non altrettanto visibili con dosi minori<sup>33</sup>. Abbiamo inoltre stimolato le cellule con IL-2 sapendo che le T regolatorie sono averse di questa citochina, supponendo che potessero per questo prevalere sulle altre cellule approfittando del blocco causato dal farmaco. L'andamento nella densità cellulare nei quadranti preposti all'individuazione delle cellule T regolatorie, visualizzati tramite la citometria a flusso, nelle prime due settimane dell'esperimento ci ha permesso di affermare che più alta è la quantità di farmaco somministrata, più alta è l'inibizione causata alle cellule T regolatorie. Questo andamento sembra bloccarsi con la rimozione del farmaco, soprattutto per quanto riguarda le cellule che hanno ricevuto la dose massima di farmaco, che sembrerebbero anzi riprendersi. Tuttavia si tratta di percentuali veramente molto basse in tutti i gruppi analizzati. L'analisi statistica ha evidenziato e confermato quanto visivamente visto con la densità cellulare dopo due settimane di coltura col farmaco. È utile porre l'attenzione soprattutto sulla differenza significativa che c'è tra Tofa 6,25 e Tofa 100: dopo due settimane di somministrazione Tofa 6,25 mostra ancora una buona percentuale di cellule T regolatorie. Si tratta di un dato molto importante perché la dose di farmaco consigliata negli studi pre-clinici è molto vicina alla concentrazione di Tofa 6,25, e questo significa che dopo due settimane di trattamento c'è ancora una buona quantità di queste cellule, mentre con dosi più alte di farmaco questa quantità diminuisce notevolmente. Il test di soppressione effettuato, ci conferma che le cellule viste col citometro sono effettivamente cellule T regolatorie ancora funzionali, per quanto la loro funzione cali all'aumentare della quantità di farmaco somministrata. Senza alcun dubbio possiamo quindi affermare che, al contrario di quanto ci aspettavamo, somministrare grandi quantità di farmaco per lungo tempo porta ad una diminuzione della quantità di cellule T regolatorie funzionali. Questa affermazione viene confermata dal saggio di metilazione, che ci mostra la percentuale di cellule che possiedono le regioni TSDR di FOXP3 demetilate, e quindi la percentuale di cellule T regolatorie funzionali. Infatti, ciò che appare molto chiaro è che con grandi quantità di farmaco le cellule T regolatorie funzionali calano anche di 2-3 volte rispetto alle cellule presenti nel gruppo di controllo che non ha mai ricevuto il farmaco durante tutta la durata dell'esperimento (Tofa 0). Purtroppo, valutando queste percentuali, risalta anche il comportamento delle cellule che hanno ricevuto una dose di Tofacitinib pari a 6,25 μM. Infatti, seppur in modo meno vistoso, anche la quantità di cellule T regolatorie in questo gruppo cala rispetto al gruppo di controllo. In alcuni casi sembrano esserci dei piccoli

picchi nelle quantità di Tregolatorie a seconda delle quantità di farmaco somministrate ma questi purtroppo non sono andamenti ben definiti e potrebbero essere esclusivamente dovuti ad un fattore donatore-dipendente.

Visti i dati raccolti con questo studio relativi all'individuazione della quantità di cellule Tregolatorie presenti durante stimolazione e rimozione di un farmaco utilizzato ad oggi in alcuni paesi come ultima chance nella cura dell'artrite reumatoide, in quei pazienti che non rispondono in modo corretto a tutte le altre possibili cure, crediamo sia utile una valutazione attenta dei rischi / benefici che questo può portare. In breve tempo infatti può portare a dei benefici grazie alla sua azione su JAK3, tuttavia abbiamo visto come con somministrazioni più lunghe possa portare ad una diminuzione nella quantità delle cellule T regolatorie funzionali.

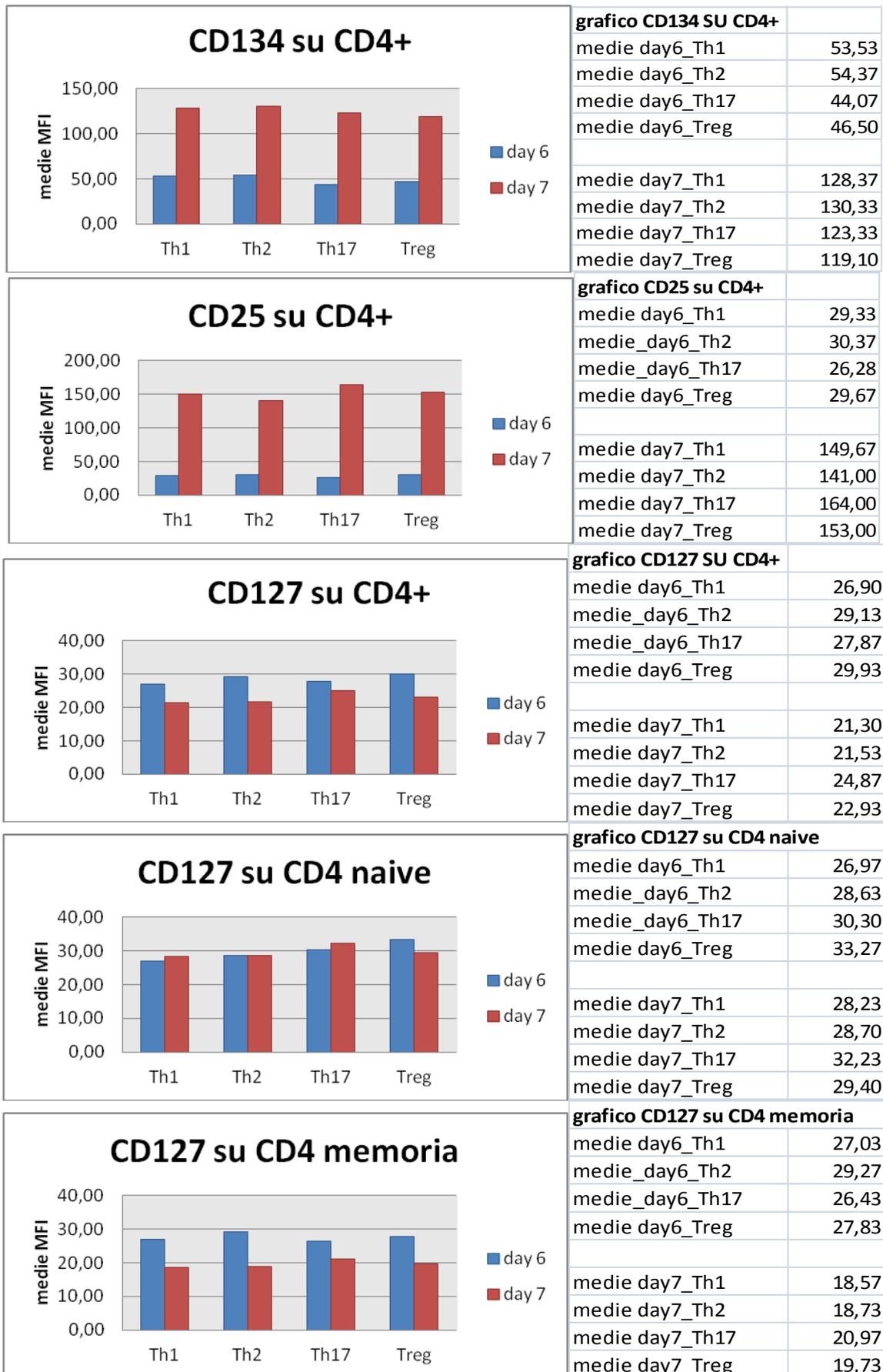
## APPENDICE

### Esperimento Preliminare: INDUZIONE DI LINEAGE CELLULARI SU CELLULE T

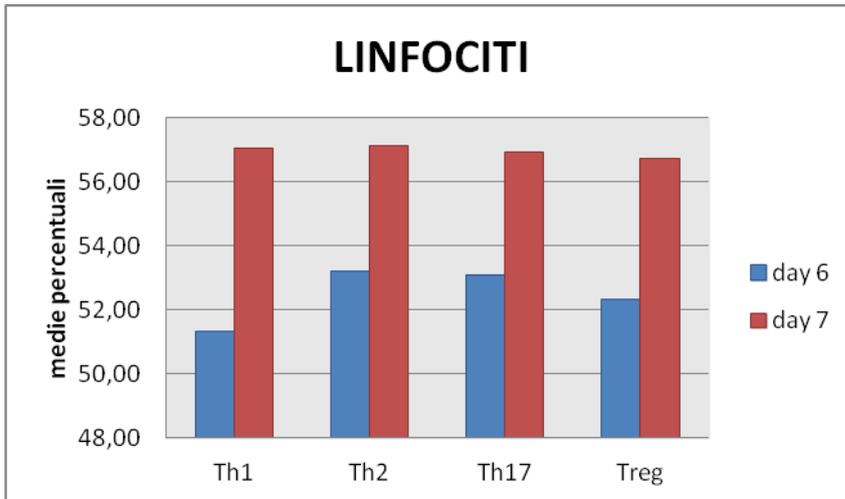


È un esperimento di 7 giorni in cui le cellule vengono tenute in coltura con il farmaco; i primi 3 giorni abbiamo dato tempo al farmaco di agire, dopodiché abbiamo somministrato ai diversi gruppi di cellule dei *cocktail* di citochine utili a promuovere il differenziamento di un determinato *lineage* cellulare in ogni gruppo. Per indurre il differenziamento in Th1 abbiamo somministrato IL-2 e IFN-γ, per le Th2 IL-2 e IL-4, per le Th17 IL-6 e TGF-β, mentre per le T regolatorie abbiamo somministrato IL-2 e TGF-β. Dopo la somministrazione del farmaco, le cellule sono state lasciate in coltura fino al sesto giorno, nel quale è stato somministrato ad ogni gruppo cellulare lo stimolo fitoemoagglutinina (PHA).

Marcatori cellulari analizzati

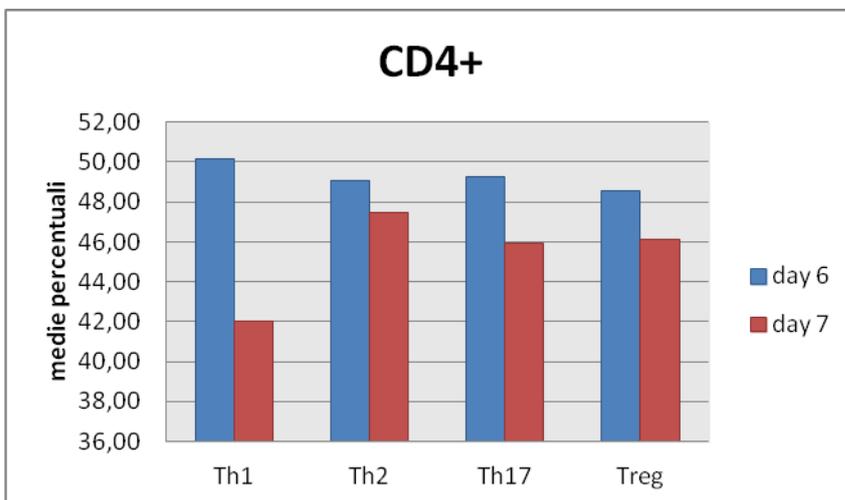


Vitalità delle cellule espressa in percentuale



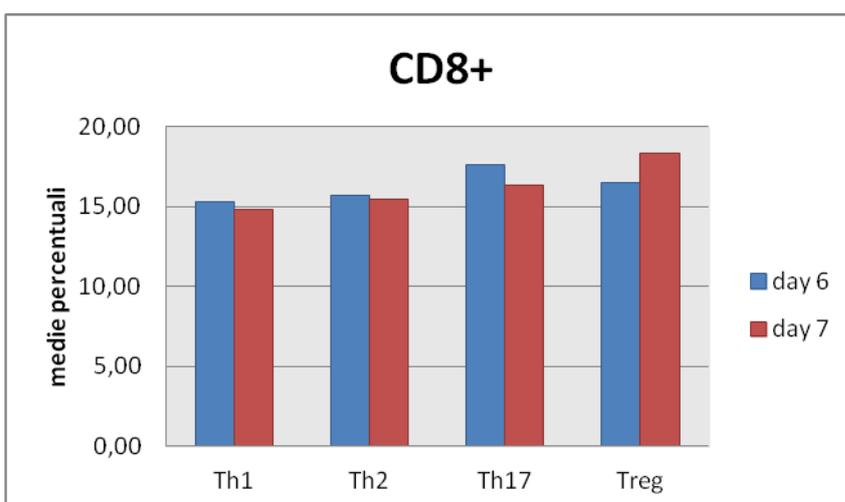
**grafico linfociti**

medie day6_Th1	51,33
medie day6_Th2	53,20
medie day6_Th17	53,10
medie day6_Treg	52,33
medie day7_Th1	57,03
medie day7_Th2	57,13
medie day7_Th17	56,93
medie day7_Treg	56,73



**grafico CD4+**

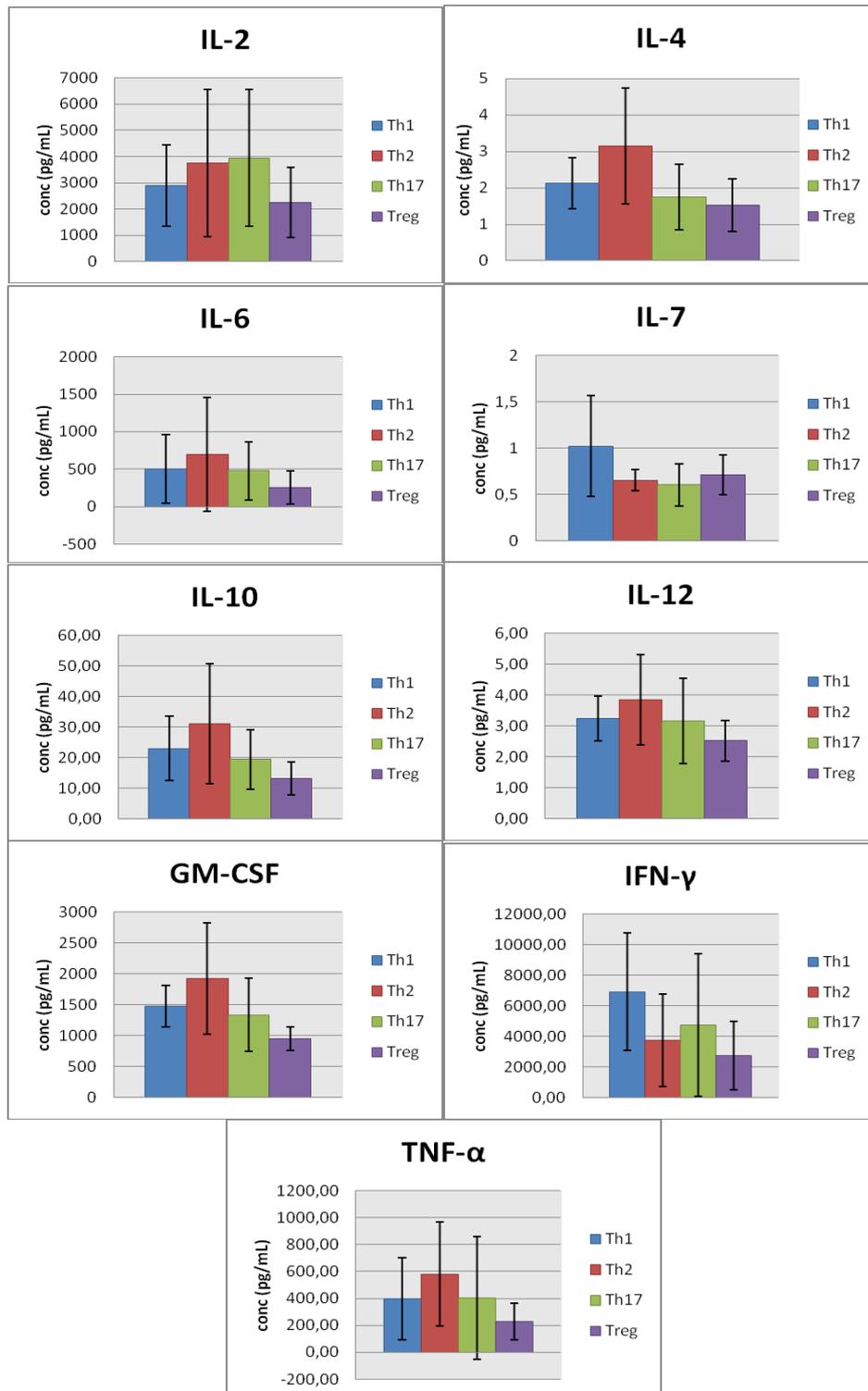
medie day6_Th1	50,17
medie day6_Th2	49,07
medie day6_Th17	49,27
medie day6_Treg	48,57
medie day7_Th1	42,00
medie day7_Th2	47,47
medie day7_Th17	45,90
medie day7_Treg	46,13



**grafico CD8+**

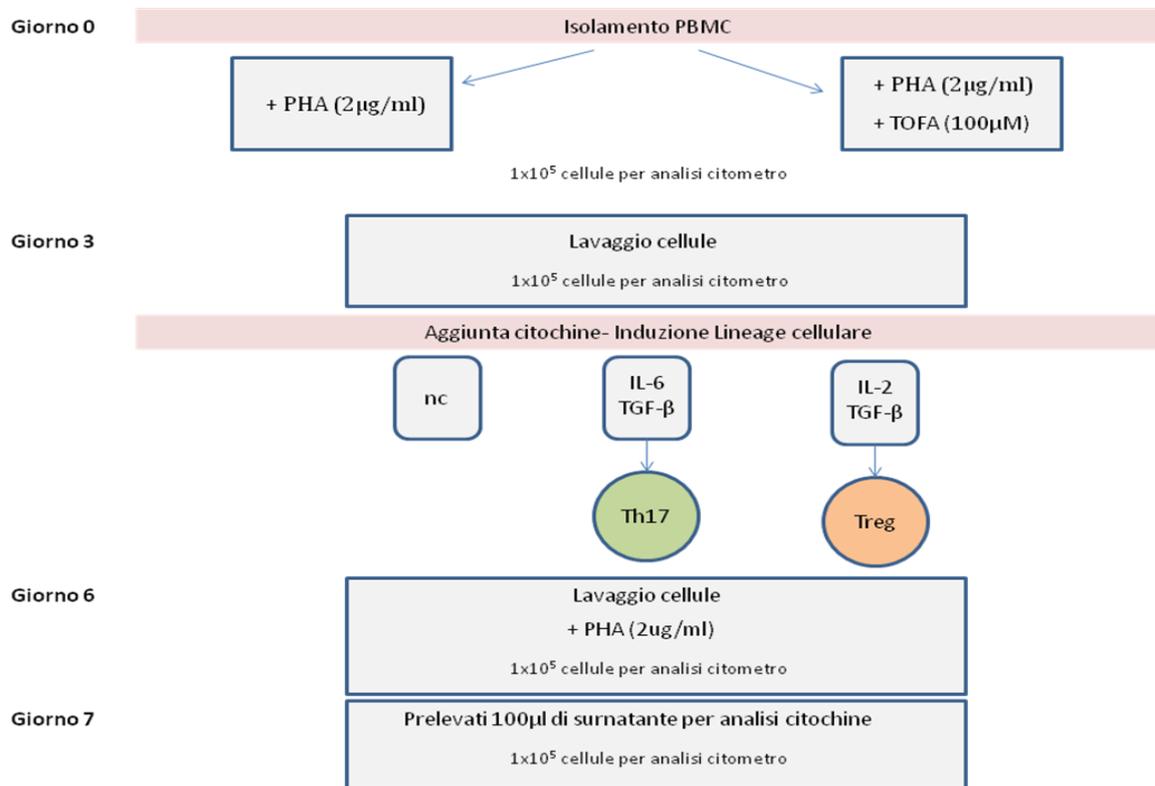
medie day6_Th1	15,30
medie day6_Th2	15,73
medie day6_Th17	17,60
medie day6_Treg	16,47
medie day7_Th1	14,86
medie day7_Th2	15,43
medie day7_Th17	16,33
medie day7_Treg	18,33

Alcune delle citochine analizzate:

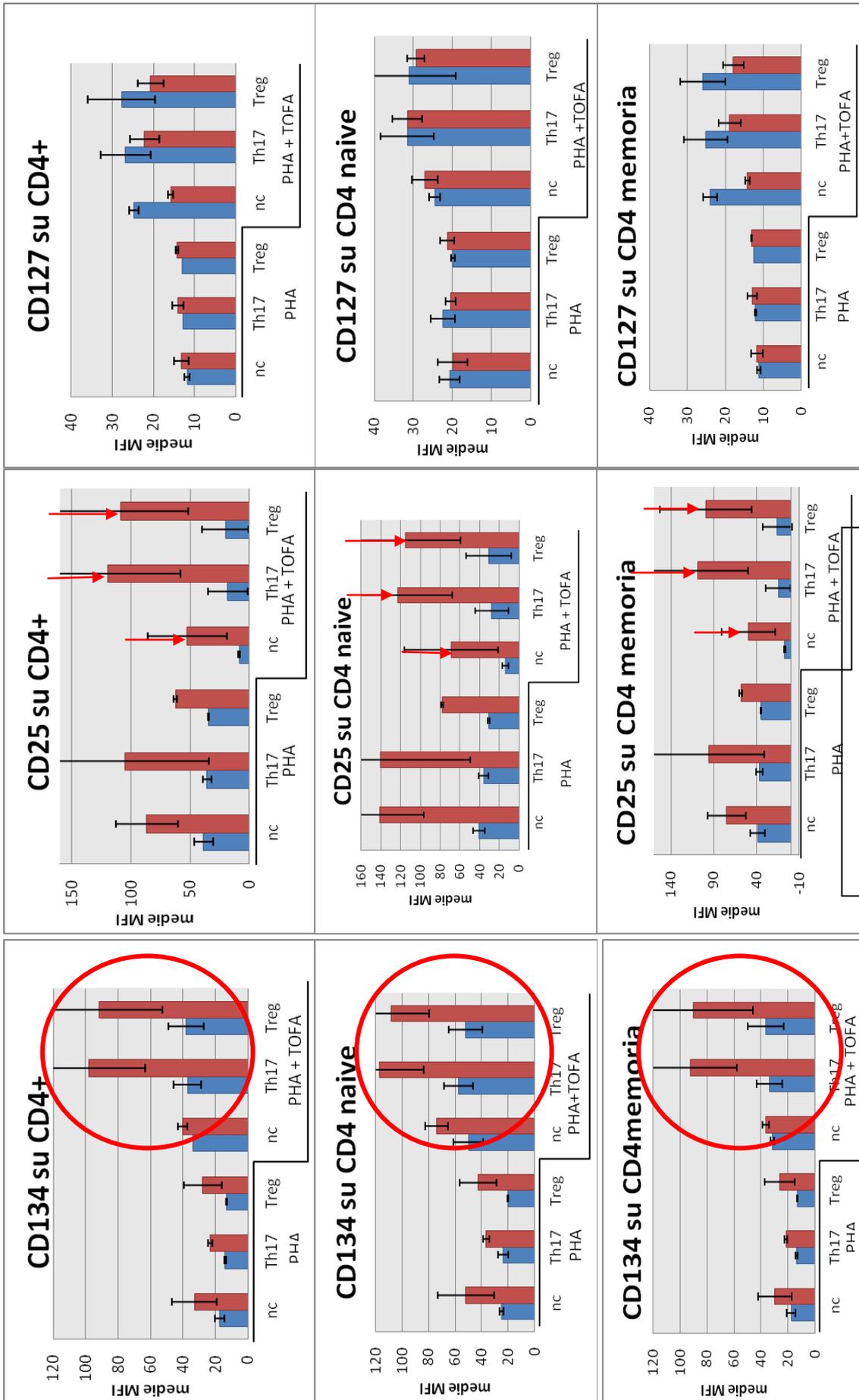


## FOCUS: INDUZIONE DI LINEAGE CELLULARE SU CELLULE

T



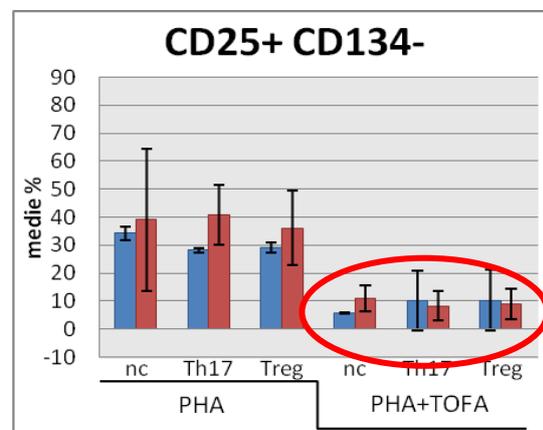
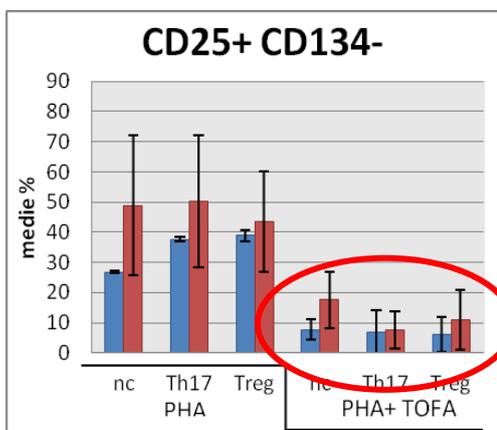
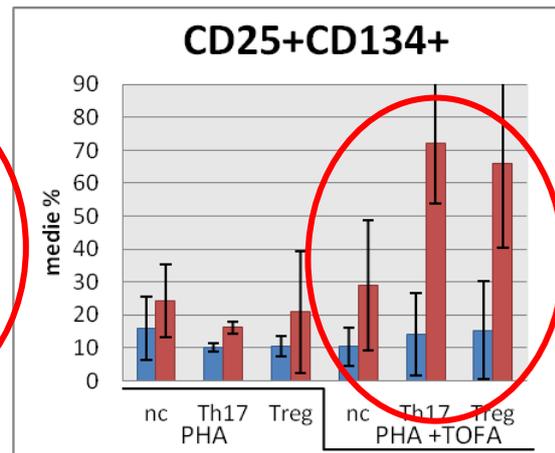
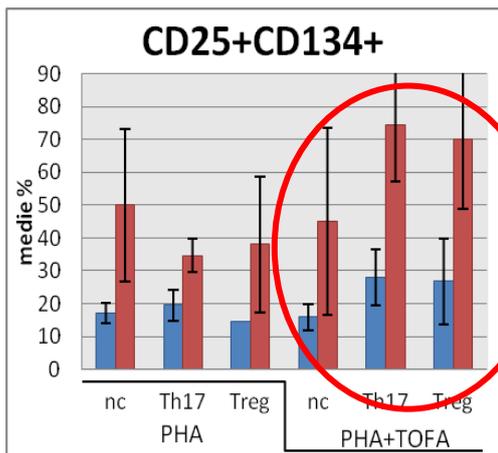
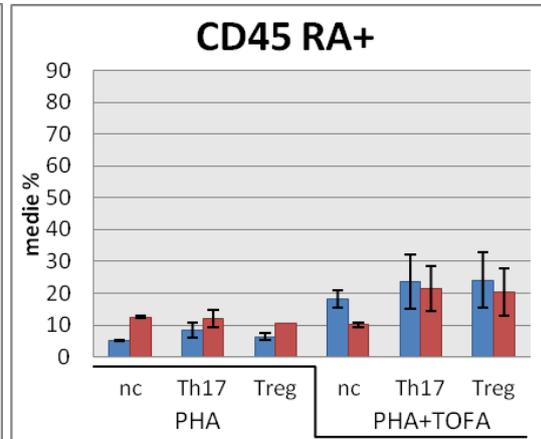
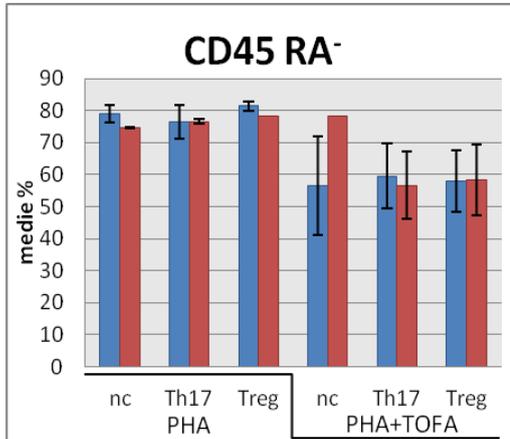
È un esperimento di 7 giorni in cui le cellule vengono tenute in coltura con il farmaco; abbiamo diviso fin da subito le cellule in due gruppi differenti: in uno le cellule vengono coltivate in presenza di Tofacitinib e di PHA, mentre in un secondo gruppo solo con la PHA, per poter valutare anche l'azione del farmaco sulle cellule. I primi 3 giorni abbiamo dato tempo al farmaco di agire, dopodiché abbiamo somministrato ai diversi gruppi di cellule dei *cocktail* di citochine utili a promuovere il differenziamento in Th17 (IL-6 e TGF-β) e in Treg (IL-2 e TGF-β). Dopo la somministrazione del farmaco, le cellule sono state lasciate in coltura fino al sesto giorno, nel quale è stato somministrato ad ogni gruppo cellulare lo stimolo fitoemoagglutinina (PHA).



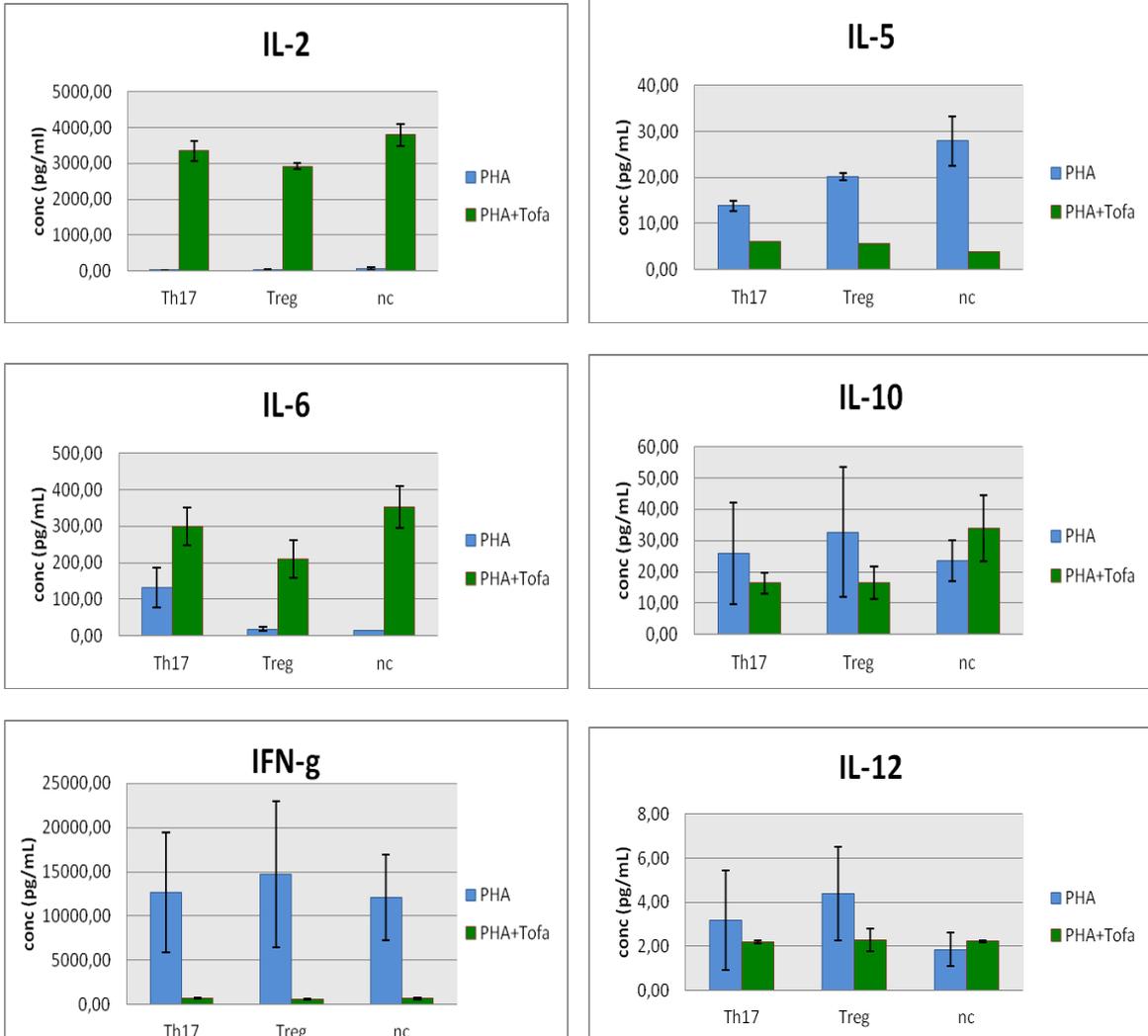
Vitalità cellulare riscontrata:

CD4+ MEMORIA

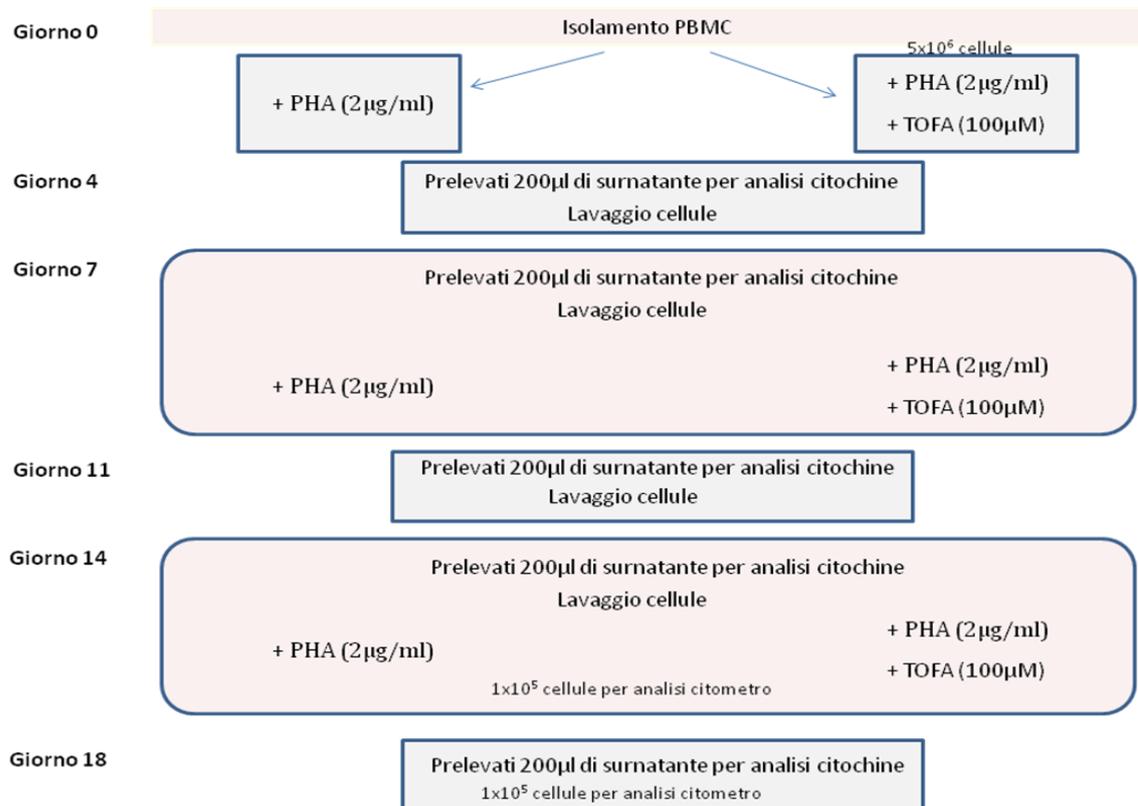
CD4+ NAIVE



Alcune delle citochine analizzate:

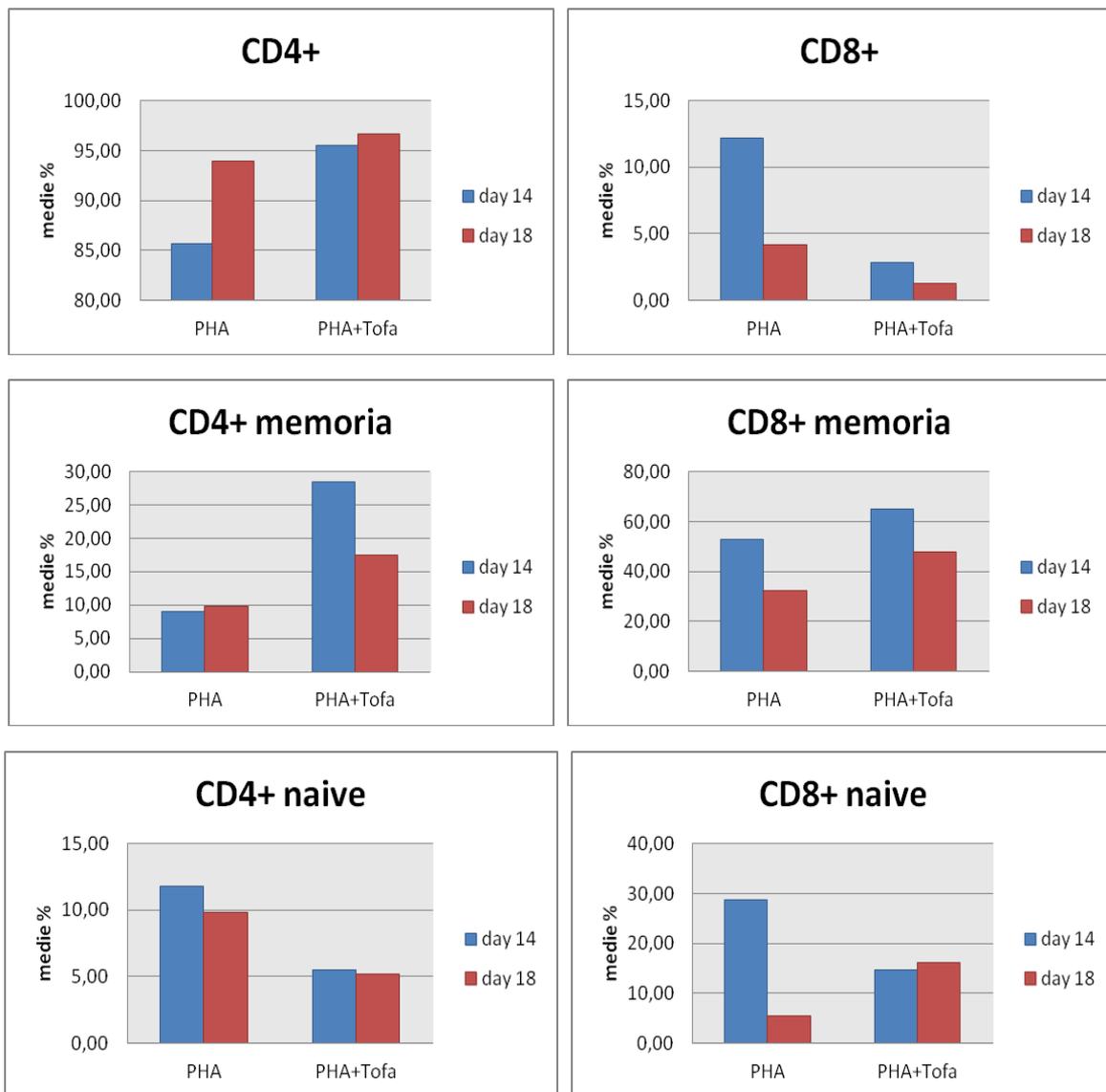


## Esperimento di soli stimoli alle cellule T

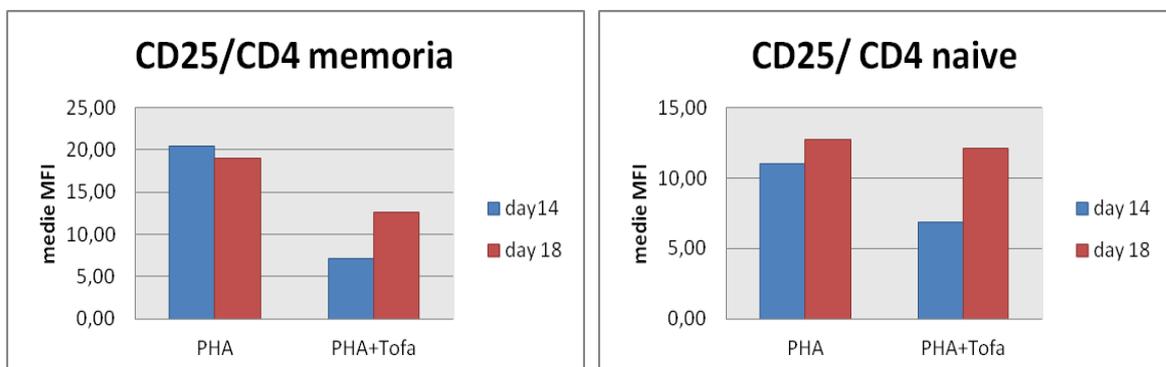


Esperimenti di 18 giorni in cui le cellule vengono fin da subito divise in due gruppi: in un gruppo vengono fin da subito stimolate con PHA e Tofacitinib mentre nell'altro gruppo vengono stimolate solo con la PHA. E' un esperimento utile a valutare gli effetti della somministrazione e della rimozione del farmaco Tofacitinib per un periodo più lungo.

Vitalità delle cellule espressa in percentuale:



Analisi, dell'attivazione cellulare nelle cellule CD4+



Valori percentuali relativi alla densità cellulare presente nei *gates* di riferimento durante l'analisi citometrica nei giorni 7, 14 e 21 dei diversi esperimenti.

	isotipo	Tofa 0	Tofa 6,25	Tofa 12,5	Tofa 25	Tofa 50	Tofa 100
GIORNO 7	0,02	35	50,7	54,9	62	65,5	59,1
	0	56,4	54,2	64,6	41,1	32,7	8,7
	0	58,9	49,9	51,7	44,9	23,6	17,4
	0,592	60,8	59,2	60	47,2	52,2	40,6
	isotipo	Tofa 0	Tofa 6,25	Tofa 12,5	Tofa 25	Tofa 50	Tofa 100
GIORNO 14	0	58,3	34,9	31,8	12,5	11	6,5
	0	54,9	44,1	20,5	17,4	4,31	0
	0	36,3	29,4	26,8	34	23,2	15,9
	isotipo	Tofa 0	Tofa 6,25	Tofa 12,5	Tofa 25	Tofa 50	Tofa 100
GIORNO 21	0	12,8	19,4	18,9	16,4	12	8,59
	0	7,01	3,7	3,59	3,04	1,94	7,69
	0,014	4,53	2,92	4,57	3,63	1,66	0,332

giorno / quantità farmaco	Conc. DNA fornito	ct Met	ct Umet	$\Delta CT$ ct Umet - ct Met	$2^{\Delta CT}$	$2^{\Delta CT + 1}$	$2^{\Delta CT} / 2^{\Delta CT + 1}$	% Met	% Umet
day 7 tofa 100	40 ng/ul	14,69	23,39	<b>8,70</b>	415,8732	416,8732269	0,997601189	<b>99,76</b>	<b>0,24</b>
day 7 tofa 50	40 ng/ul								
day 7 tofa 25	40 ng/ul	15,1	21,38	<b>6,28</b>	77,70847	78,7084726	0,987294887	<b>98,73</b>	<b>1,27</b>
day 7 tosa 12,5	40 ng/ul	12,42	19,35	<b>6,93</b>	121,9377	122,9376637	0,991865796	<b>99,19</b>	<b>0,81</b>
day 7 tofa 6,25	40 ng/ul	14,04	20,94	<b>6,90</b>	119,4282	120,4282229	0,991696299	<b>99,17</b>	<b>0,83</b>
day 7 tofa 0	40 ng/ul	14,2	19,29	<b>5,09</b>	34,05985	35,05984584	0,971477342	<b>97,15</b>	<b>2,85</b>
day 14 tofa 100	40 ng/ul	13,56	22,12	<b>8,56</b>	377,4129	378,4129196	0,997357384	<b>99,74</b>	<b>0,26</b>
day 14 tofa 50	40 ng/ul	14,67	21,02	<b>6,35</b>	81,57188	82,57188015	0,98788934	<b>98,79</b>	<b>1,21</b>
day 14 tofa 25	40 ng/ul	14,13	20,97	<b>6,84</b>	114,5632	115,5632091	0,991346727	<b>99,13</b>	<b>0,87</b>
day 14 tosa 12,5	40 ng/ul	14,4	20,99	<b>6,59</b>	96,33579	97,33579183	0,989726287	<b>98,97</b>	<b>1,03</b>
day 14 tofa 6,25	40 ng/ul	14,7	20,85	<b>6,15</b>	71,01245	72,01244621	0,986113512	<b>98,61</b>	<b>1,39</b>
day 14 tofa 0	40 ng/ul	14,14	21,01	<b>6,87</b>	116,9704	117,9704256	0,991523299	<b>99,15</b>	<b>0,85</b>
day 21 tofa 12,5	40 ng/ul	13,25	21,12	<b>7,87</b>	233,9409	234,9408513	0,99574361	<b>99,57</b>	<b>0,43</b>
day 21 tofa 6,25	40 ng/ul	14,24	20,63	<b>6,39</b>	83,86518	84,86517785	0,988216604	<b>98,82</b>	<b>1,18</b>
day 21 tofa 0	40 ng/ul	14,01	19,18	<b>5,17</b>	36,00187	37,00187151	0,97297434	<b>97,30</b>	<b>2,70</b>
day 7 tofa 100	40 ng/ul	14,52	20,9	<b>6,38</b>	83,28588	84,28587875	0,988135616	<b>98,81</b>	<b>1,19</b>
day 7 tofa 50	40 ng/ul	14,36	21,24	<b>6,88</b>	117,784	118,7840193	0,991581359	<b>99,16</b>	<b>0,84</b>
day 7 tofa 25	40 ng/ul	13,45	22,47	<b>9,02</b>	519,1473	520,1472537	0,998077467	<b>99,81</b>	<b>0,19</b>
day 7 tosa 12,5	40 ng/ul	14,4	21,83	<b>7,43</b>	172,4459	173,4458978	0,994234513	<b>99,42</b>	<b>0,58</b>
day 7 tofa 6,25	40 ng/ul	14,04	21,57	<b>7,53</b>	184,8229	185,822937	0,994618533	<b>99,46</b>	<b>0,54</b>
day 7 tofa 0	40 ng/ul	14,44	21,75	<b>7,31</b>	158,6826	159,6825856	0,993737576	<b>99,37</b>	<b>0,63</b>
day 14 tofa 100	40 ng/ul	13,37	20,63	<b>7,26</b>	153,2773	154,2772742	0,993518164	<b>99,35</b>	<b>0,65</b>
day 14 tofa 50	40 ng/ul	14,28	21,87	<b>7,59</b>	192,6716	193,6715837	0,994836662	<b>99,48</b>	<b>0,52</b>
day 14 tofa 25	40 ng/ul	14,43	21,65	<b>7,22</b>	149,0859	150,0858991	0,993337149	<b>99,33</b>	<b>0,67</b>
day 14 tosa 12,5	40 ng/ul	14,75	23,11	<b>8,36</b>	328,557	329,5570298	0,996965624	<b>99,70</b>	<b>0,30</b>
day 14 tofa 6,25	40 ng/ul	14,08	20,19	<b>6,11</b>	69,07061	70,07060714	0,985728681	<b>98,57</b>	<b>1,43</b>
day 14 tofa 0	40 ng/ul	13,27	19,22	<b>5,95</b>	61,81993	62,81992505	0,984081484	<b>98,41</b>	<b>1,59</b>
day 21 tofa 100	40 ng/ul	13,23	21,26	<b>8,03</b>	261,3791	262,3791042	0,996188721	<b>99,62</b>	<b>0,38</b>
day 21 tofa 50	40 ng/ul	11,74	18,8	<b>7,06</b>	133,4356	134,4356174	0,992561495	<b>99,26</b>	<b>0,74</b>
day 21 tofa 6,25	40 ng/ul	12,22	20,07	<b>7,85</b>	230,7201	231,7201184	0,995684449	<b>99,57</b>	<b>0,43</b>
day 21 tofa 0	40 ng/ul	13,94	20,55	<b>6,61</b>	97,68059	98,68058937	0,989866295	<b>98,99</b>	<b>1,01</b>
day 7 tofa 100	40 ng/ul	14,81	21,33	<b>6,52</b>	91,77314	92,77313587	0,989221018	<b>98,92</b>	<b>1,08</b>
day 7 tofa 50	40 ng/ul	15,23	20,74	<b>5,51</b>	45,56961	46,56960626	0,978526767	<b>97,85</b>	<b>2,15</b>
day 7 tofa 25	40 ng/ul	15,28	21,05	<b>5,77</b>	54,56863	55,56863307	0,982004236	<b>98,20</b>	<b>1,80</b>
day 7 tosa 12,5	40 ng/ul	14,44	21,69	<b>7,25</b>	152,2185	153,2185107	0,993473373	<b>99,35</b>	<b>0,65</b>
day 7 tofa 6,25	40 ng/ul	14,02	20,43	<b>6,41</b>	85,03589	86,0358921	0,988376944	<b>98,84</b>	<b>1,16</b>
day 7 tofa 0	40 ng/ul	13,29	18,41	<b>5,12</b>	34,77552	35,7755156	0,972047922	<b>97,20</b>	<b>2,80</b>
day 14 tofa 100	40 ng/ul	12,53	18,45	<b>5,92</b>	60,54769	61,54768939	0,983752436	<b>98,38</b>	<b>1,62</b>
day 14 tofa 50	40 ng/ul	14,25	21,17	<b>6,92</b>	121,0954	122,0953788	0,991809682	<b>99,18</b>	<b>0,82</b>
day 14 tofa 25	40 ng/ul	14,57	21,1	<b>6,53</b>	92,41147	93,41146851	0,989294676	<b>98,93</b>	<b>1,07</b>
day 14 tosa 12,5	40 ng/ul	13,81	20,56	<b>6,75</b>	107,6347	108,6347412	0,990794842	<b>99,08</b>	<b>0,92</b>
day 14 tofa 6,25	40 ng/ul	13,14	19,7	<b>6,56</b>	94,35323	95,35322991	0,989512678	<b>98,95</b>	<b>1,05</b>
day 14 tofa 0	40 ng/ul	14,09	19,39	<b>5,30</b>	39,39662	40,39662123	0,975245454	<b>97,52</b>	<b>2,48</b>

Tabella in cui si vedono i diversi passaggi che hanno portato a definire la percentuale di metilazione e di demetilazione nelle regioni TSDR di FOXP3 dei campioni analizzati. Basandosi sui valori dati dalla macchina di REAL TIME PCR abbiamo poi calcolato le percentuali di metilazione partendo dal  $\Delta CT$  di ogni campione.

## BIBLIOGRAFIA

1

[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/GENOME/PROBE/DOC/TECHQPCR.SHTML](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/techqpcr.shtml). **Real-Time qRT-PCR**.

2

RANG, H. et al. **Farmacologia**. VI. 2009.

3

ABBAS. **Cellular and molecular immunology**. 2012.

4

ABBAS. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th edition. 2007.

5

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-69, Sep 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725574> >.

6

MACDONALD, K. G.; ORBAN, P. C.; LEVINGS, M. K. T regulatory cell therapy in transplantation: stability, localization and functional specialization. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 17, n. 4, p. 343-8, Aug 2012. ISSN 1531-7013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790068> >.

7

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-87, May 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923> >.

8

SETOGUCHI, R. et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 723-35, Mar 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753206> >.

9

[WWW.STUDYDROID.COM](http://www.studydroid.com).

10

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 531-62, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032588> >.

- 11 SETHI, A. et al. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. **Front Genet**, v. 4, p. 8, 2013. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386861> >.
- 12 OHKURA, N. et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 785-99, Nov 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123060> >.
- 13 BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 20-1, Jan 2001. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137993> >.
- 14 WIECZOREK, G. et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. **Cancer Res**, v. 69, n. 2, p. 599-608, Jan 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147574> >.
- 15 FLUSBERG, B. A. et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. **Nat Methods**, v. 7, n. 6, p. 461-5, Jun 2010. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453866> >.
- 16 FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 5, p. 1827-31, Mar 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542678> >.
- 17 SULEWSKA, A. et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 45, n. 4, p. 315-24, 2007. ISSN 1897-5631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165169> >.
- 18 FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 331-7, Apr 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785758> >.
- 19 FLOESS, S. et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. **PLoS Biol**, v. 5, n. 2, p. e38, Feb 2007. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298177> >.
- 20 BARON, U. et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. **Eur J Immunol**,

- v. 37, n. 9, p. 2378-89, Sep 2007. ISSN 0014-2980. Disponibile em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694575> >.
- 21 LIU, J. et al. T regulatory cells in cord blood--FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13267, 2010. ISSN 1932-6203. Disponibile em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967272> >.
- 22 TATURA, R. et al. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49962, 2012. ISSN 1932-6203. Disponibile em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209626> >.
- 23 TESSER, A. **I linfociti regolatori 10 anni dopo: una pallottola magica che ancora non trova la sua strada.** Articoli AIRInforma 2015.
- 24 MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's IMMUNOBIOLOGIA.** VII edizione. 2010.
- 25 ONLUS, A. I. R. A. **Proposta di Legge: disposizioni per assicurare adeguata assistenza sanitaria ai soggetti affetti da malattie osteoarticolari croniche e autoimmuni** 2009.
- 26 A.I.R.A. **Malattie Reumatiche** \_ [www.reumatoide.it](http://www.reumatoide.it).
- 27 GUIDELINES, A. C. O. R. S. O. R. A. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 2, p. 328-46, Feb 2002. ISSN 0004-3591. Disponibile em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840435> >.
- 28 SERRA, G. **I farmaci biologici nel trattamento dell'artrite reumatoide. Focus su etanercept.** Giornale Italiano di Health Technology Assessment 2009.
- 29 ROSMAN, Z.; SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. **BMC Med**, v. 11, p. 88, 2013. ISSN 1741-7015. Disponibile em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557513> >.

- 30 SCOTT, D. L. Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Pharmacol Ther**, v. 91, n. 1, p. 30-43, Jan 2012. ISSN 1532-6535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166850> >.
- 31 MALEMUD, C. J. **The clinical efficacy of a JAK3-selective small molecule inhibitor, Tofacitinib, in Rheumatoid Arthritis.** Austin Journal of Clinical Immunology 2014.
- 32 MALEMUD, C. **suppression of pro-inflammatory cytokines via targeting of STAT-responsive genes.** 2013. ISBN 978-953-51-0906-8.
- 33 PISCIANZ, E. et al. Fate of lymphocytes after withdrawal of tofacitinib treatment. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85463, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416411> >.
- 34 TANAKA, Y.; YAMAOKA, K. JAK inhibitor tofacitinib for treating rheumatoid arthritis: from basic to clinical. **Mod Rheumatol**, v. 23, n. 3, p. 415-24, May 2013. ISSN 1439-7609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212593> >.
- 35 CUTOLO, M. The kinase inhibitor tofacitinib in patients with rheumatoid arthritis: latest findings and clinical potential. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 5, n. 1, p. 3-11, Feb 2013. ISSN 1759-720X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515130> >.
- 36 BURMESTER, G. R. et al. Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 451-60, Feb 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294500> >.
- 37 KREMER, J. M. et al. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 7, p. 1895-905, Jul 2009. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565475> >.
- 38 FLEISCHMANN, R. et al. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 367, n. 6, p. 495-507, Aug 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873530> >.
- 39 **Xeljanz - re-examination CHMP opinion negative.**

- 40 SINGH, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, n. 1, p. 1-26, Jan 2016. ISSN 2326-5205. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26545940> >.
- 41 BATTAGLIA, M.; STABILINI, A.; RONCAROLO, M. G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4743-8, Jun 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746082> >.