



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Scuola di Dottorato in Scienze della Vita e della Salute

DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA MEDICA

Tesi di dottorato

*“L’espansione di linfociti T regolatori (T_{REG}) quale
approccio verso l’induzione di tolleranza immunologica nel
trapianto renale”*

Candidata

Dott.ssa Caterina Dolla

Tutor

Prof. Luigi Biancone

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

INTRODUZIONE

Immunita`e Tolleranza

Il rigetto nel trapianto d'organo

Terapia immunodepressiva ed mTOR inibitori

Trombospondina-1

Cellule staminali provenienti dal midollo osseo

SCOPO DELLO STUDIO

MATERIALI E METODI

Parte PRIMA

Descrizione della popolazione selezionata

Raccolta dei dati relativi alla popolazione selezionata

Campionamento e misurazione delle popolazioni linfocitarie e della TSP-1

Analisi citofluorimetrica

Isolamento di linfociti T e B

Analisi *Real Time qRT*

Saggio *ELISA*

Coltura e isolamento di cellule tubulari epiteliali umane (TEC)

Coltura di cellule endoteliali peritubulari (PEC)

Adesione dei PBMC sulle TEC e sulle PEC

Analisi statistica

Parte SECONDA

Isolamento e caratterizzazione delle MSCs umane

Isolamento delle MVs dalle MSCs

Caratterizzazione delle MSC e delle MSC-MVs

Isolamento dei linfociti B

Isolamento dei linfociti T

Internalizzazione delle MV

Transfer dell'mRNA di Foxp3 e TSP-1 dalle MVs di MSCs ai linfociti T

Co-culture di linfociti T e B

Analisi statistica

RISULTATI

Parte PRIMA

Profilo clinico delle popolazioni in studio

Analisi citofluorimetrica delle popolazioni linfocitarie T_{REG}, T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti in studio

Valutazione del livello ematico di TSP-1 nei pazienti in studio

Esperimenti in vitro sui linfociti

Differenziazione dei linfociti T e B nelle popolazioni regolatorie e memoria in seguito a stimolazione con farmaci di diverse classi

Valutazione della produzione di TSP-1 linfocitaria a livello basale

Valutazione della produzione di TSP-1 linfocitaria dopo stimolazione con mTORi e TAC

Ruolo della TSP-1 nella differenziazione linfocitaria

Esperimenti in vitro sulle cellule renali

Modulazione della produzione di TSP-1 nelle TEC stimulate con RAPA/EVE/TAC

Parte SECONDA

Rigetto T cellulo-mediato

Caratterizzazione delle MVs di origine dalle MSCs

Internalizzazione delle MVs nei linfociti T e B

Trasferimento di mRNA di Foxp3 nei linfociti T mediato dalle MVs di MSCs

Co-culture di linfociti T e B

Transfer di mRNA di TSP-1 nei linfociti T da parte delle MVs di MSCs

DISCUSSIONE

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

Parte prima

INTRODUZIONE

CAP. 1: IMMUNITA` E TOLLERANZA

Il sistema immunitario è caratterizzato da una complessa rete integrata di mediatori chimici e cellulari, interagenti tra loro, sviluppatasi nel corso dell'evoluzione allo scopo di difendere l'organismo da qualsiasi forma di insulto in grado di ledere la sua integrità.

La funzione della risposta immunitaria si esplica dunque nella distinzione tra ciò che viene definito "self" e "non self" e nella successiva eliminazione delle entità estranee, capaci di provocare un danno all'organismo.

Le strategie di difesa che si sono evolute al fine di svolgere la funzione immunitaria sono due: l'immunità innata (aspecifica) e l'immunità adattativa (specific).

Linfociti T e immunità cellulare

I linfociti T maturano, acquisiscono le capacità funzionali che li contraddistinguono e apprendono il concetto di *self* a partire da un precursore immaturo originato nel midollo osseo. Ognuna di queste tappe avviene a livello del timo, dove i linfociti T che riconoscono un complesso MHC-antigene esogeno vanno incontro a selezione positiva mentre le cellule che reagiscono alla presentazione di antigeni endogeni subiscono selezione negativa e vengono eliminate. Il precursore genera in prima istanza una popolazione di cellule eterogenee dotate di un vasto repertorio di recettori (TCR) di membrana tra loro differenti grazie ad un processo di riarrangiamento somatico. Il riarrangiamento dei geni codificanti per le strutture del TCR si verifica durante la maturazione delle cellule T all'interno del timo.

I linfociti T *naive* così originati migrano a livello degli organi linfatici secondari, a livello dei quali entrano in contatto con gli antigeni che possiedono specificità compatibili con il loro recettore. Avviene in questo modo la selezione clonale di quel linfocita risultato in grado di legare lo specifico antigene con maggior affinità. Segue poi espansione clonale e generazione di un clone di cellule T identiche, le quali esprimono lo stesso recettore.

Le cellule T mature *naive* costituiscono circa il 60-70% dei linfociti circolanti e si ritrovano oltre che nel torrente ematico, anche a livello delle aree T degli organi linfoidi periferici.

I linfociti T possono andare incontro ad attivazione solo grazie al legame con antigeni complessati con MHC di membrana di cellule presentanti l'antigene (APC); non hanno infatti la capacità di reagire ad antigeni solubili circolanti.

I recettori delle cellule T sono in grado di riconoscere un gran numero di peptidi ma ogni linfocita esprime molecole di TCR di una sola struttura e specificità.

I linfociti T esprimono un certo numero di molecole non polimorfiche, molecole funzione-associate, dette anche molecole accessorie, come CD4, CD8, CD2, CD28 e integrine. CD4 e CD8, glicoproteine di membrana delle cellule T, con funzione di corecettori, sono espressi da due sottoclassi mutualmente esclusive di linfociti T. Durante la presentazione dell'antigene CD4 lega le porzioni non polimorfiche delle molecole MHC di classe II mentre CD8 quelle delle molecole di classe I.

I linfociti T che esprimono il CD4 prendono il nome di linfociti T *helper* (Th), quelli che esprimono il CD8 di linfociti T citotossici (Tc).

Le cellule T necessitano di due segnali per poter andare incontro ad attivazione: il primo segnale è fornito dal legame del TCR con il complesso MHC-antigene e del CD4/CD8 con la molecola di MHC, il secondo segnale deriva invece, dall'interazione della molecola CD28 presente sulle cellule T con la molecola B7-1, con funzione di costimolatore, presente sull'APC.

L'importanza della co-stimolazione è attestata dal fatto che in assenza di questa, la cellula T va incontro ad apoptosi o diventa una cellula areattiva.

I linfociti T attivati acquisiscono la capacità di secernere proteine ad azione locale, dette citochine; tra queste, l'interleuchina 2 (IL-2) che determina la proliferazione delle cellule T attivate, permettendo quindi la generazione di un numero notevole di linfociti antigeni-specifici. Alcuni tra questi linfociti antigene-specifici, differenzieranno in cellule effettrici, altri in cellule memoria.

Il linfocita T *helper* (Th) CD4⁺ può essere considerato come il principale regolatore della risposta immunitaria, in quanto in grado di influenzare la funzione di tutte le altre cellule implicate, grazie alla secrezione di particolari citochine. Due popolazioni di T CD4⁺ possono essere individuate sulla base delle differenti tipologie di citochine che vengono prodotte: Th1 e Th2.

La sottoclasse Th1 sintetizza e secreta IL-2 e INF- γ , favorendo l'ipersensibilità ritardata, l'attivazione dei macrofagi, la sintesi di anticorpi (Ab) opsonizzanti e fissanti il complemento. I Th2 invece, grazie alla produzione di IL-4, IL-5 e IL-13, stimolano la sintesi di Ab con altre funzioni e l'attivazione degli eosinofili.

La differenziazione del Th in una delle due sottoclassi è determinata dalla presenza nel microambiente di una particolare citochina piuttosto che di un'altra; l'INF- γ e l'IL-12 promuovono lo sviluppo di Th1, viceversa la presenza di IL-4 e IL-10 indirizza la differenziazione verso la sottoclasse Th2.

In generale inoltre i linfociti Th1 favoriscono l'attivazione dell'immunità cellulare contrariamente ai Th2 i quali promuovono l'attivazione di quella umorale.

I linfociti T CD8⁺ e CD4⁺ naive, vengono selezionati nel timo ed immessi nella circolazione ematica e linfatica dove permangono finché muoiono o incontrano l'antigene. Tale incontro induce proliferazione clonale e successivo differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici, linfociti T citotossici maturi nel caso dei T CD8⁺, e della memoria.

Le cellule T citotossiche, anch'esse in grado di secernere citochine, svolgono il compito di distruggere tutte quelle cellule che presentano complessi MHC-antigeni "non self".

In seguito al riconoscimento di un peptide esogeno, il linfocita viene attivato e dà origine a tutti quei segnali che porteranno alla distruzione del *target*: segnali pro-apoptotici che esitano nella lisi della membrana cellulare.

La necrosi o apoptosi della cellula *target* può essere raggiunta grazie alla liberazione da parte dei T citotossici di una serie di proteine, come le perforine e *granzymes*.

Innumerevoli altri meccanismi come l'espressione sulla membrana del FAS-ligando, di ATP, di TRAIL e la secrezione di TNF e di citochine, contribuiscono a determinare la distruzione del bersaglio.

I linfociti T citotossici partecipano attivamente alla risposta verso le infezioni intracellulari, nel rigetto dei trapianti d'organo e nell'immunosorveglianza verso antigeni tumorali.

I linfociti T memoria

In seguito ad un'infezione o ad una vaccinazione si verifica la fase acuta della risposta immune, in cui i linfociti T CD8⁺ naive, reclutati dalla periferia, proliferano e differenziano in cellule effettrici antigene-specifiche ed in cellule della memoria. Il processo di differenziamento dei T CD4⁺ segue un andamento sovrapponibile, tuttavia il programma differenziativo sembra essere maggiormente influenzato da fattori esterni come la durata dell'esposizione all'antigene e la combinazione di citochine presenti nell'ambiente. In seguito all'eliminazione dell'antigene gran parte degli effettori muore per apoptosi, alcuni di essi tuttavia sopravvivono e vanno a costituire il pool della memoria.

Tali cellule, caratterizzate dall'espressione del marcatore di superficie CD45RO, sono in grado di persistere anche per tutta la vita dell'individuo e di garantire protezione in caso di una re-infezione con il patogeno precedentemente incontrato, attraverso risposte più rapide ed efficaci.

I meccanismi che governano lo sviluppo ed il mantenimento delle cellule T memoria non sono ancora ben definiti; vi sono infatti, teorie contrastanti circa le modalità di attivazione delle stesse. In questo contesto è fondamentale il supporto dei linfociti T *helper*.

Ulteriori studi affermano che i T memoria non abbiano un' intrinseca longevità e necessitino per questo di continui stimoli, come le citochine (in particolare IL-15), a sostegno della loro proliferazione basale, preferenzialmente localizzata nel midollo osseo.

Studi recenti hanno dimostrato la presenza all'interno del pool di cellule T memoria di due sottopopolazioni, indicate come *central T memory* (T_{CM}) e *effector T memory* (T_{EM}), caratterizzate da differente capacità di *homing* e differenti funzioni effettrici.

La memoria di protezione sarebbe mediata dalle T_{CM} grazie alla loro capacità di migrare nei tessuti periferici infiammati e di innescare una risposta immunitaria immediata. La memoria reattiva sarebbe invece dipendente dalle T_{CM} residenti a livello delle zone T degli organi linfoidi secondari, prive di funzioni effettrici, ma capaci di proliferare e differenziare rapidamente in T effettori in risposta alla stimolazione antigenica.

Linfociti B e immunità umorale

I linfociti B costituiscono quella popolazione linfocitaria originata da precursori staminali midollari, che va incontro a maturazione all'interno del midollo osseo.

Le cellule B mature costituiscono circa il 15% della popolazione linfocitaria circolante periferica, viceversa si ritrovano in numero abbondante a livello degli organi linfoidi periferici come linfonodi, tonsille, milza e nei tessuti linfatici associati alle mucose.

I linfociti B *naïve* riconoscono l'antigene attraverso un complesso recettoriale di cui la componente legante l'antigene è costituita dalle immunoglobuline (Ig) M e D.

Come per le cellule T, ogni recettore dei linfociti B possiede una sola specificità antigenica derivata da riarrangiamenti somatici dei geni delle Ig.

L'incontro tra l'Ig e l'antigene nella sua forma naturale, solubile, determina l'attivazione delle cellule B con successiva proliferazione e produzione di un clone cellulare con Ig di membrana identiche nella loro porzione variabile.

Successivamente all'attivazione il linfocita B endocita il complesso Ig-antigene e procede quindi alla sua degradazione a livello endolisosomiale; i peptidi così derivati vengono complessati con una molecola di MHC di classe II e presentati sulla membrana. Il linfocita acquisisce in questo modo funzione di APC e solo l'incontro con un Th permetterà il completamento della sua maturazione.

Il riconoscimento del peptide esogeno da parte del linfocita T determina la trasduzione del segnale grazie al CD3 e l'espressione in membrana del CD40 ligando. Questo interagirà con il corrispettivo recettore (CD40), presente sulla superficie della cellula B, e tale evento determinerà a sua volta l'attivazione del B e la trasduzione del segnale all'interno della cellula.

Tale segnale determina l'esposizione in membrana del B7, molecola in grado di legarsi al CD28 presente sulla superficie del linfocita T; quest'ultima interazione promuove infine la secrezione da parte dello stesso linfocita T, di una serie di citochine e di interferone.

Le citochine e l'interferone forniscono quindi i segnali di costimolazione necessari per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione della cellula B.

Tale processo avviene a livello del linfonodo, ma affinché l'interazione sia corretta, sia il linfocita B che il linfocita T devono essere stati attivati dal contatto con lo stesso antigene. L'attivazione del linfocita T, è infatti possibile grazie alla presenza di cellule APC, ovvero di un macrofago o una cellula dendritica, in grado di presentare l'antigene al linfocita e di determinarne un' espansione clonale.

Il linfocita B attivato ha di fronte a sé due possibili destini: la trasformazione in plasmacellula, grazie ad una serie di modificazioni morfologiche, oppure la differenziazione in B *memory*.

La differenziazione in un senso o nell'altro è determinata dai segnali che provengono dalle differenti cellule e dai fattori solubili che si trovano nel microambiente.

Successivamente alla trasformazione la cellula B migra nel midollo osseo, a livello del quale rimane bloccata in fase G₁-S non potendo più proliferare oppure si localizza a livello degli organi linfoidei e delle mucose, a livello delle quali secerne Ig solubili.

Ogni plasmacellula possiede una sola specificità antigenica ed è in grado di produrre una sola classe di Ig, la stessa che il linfocita B presentava in membrana al momento della trasformazione. Tale regola viene a mancare quando si verifica lo *switch* isotipico, fenomeno per cui le plasmacellule possono variare la classe di Ig prodotta senza tuttavia modificarne la specificità.

Le Ig, tetrameri costituiti dall'associazione di due catene pesanti e due catene leggere, possono appartenere a cinque differenti classi ognuna con funzione differente: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. La differenziazione in una o nell'altra classe è stabilita dalla catena pesante va a costituire la loro struttura.

Le immunoglobuline sono in grado di legare e neutralizzare gli antigeni che presentano una struttura a loro complementare, e risultano capaci di attivare il complemento tramite la loro porzione Fc. La stimolazione del sistema del

complemento comporta promozione della fagocitosi, distruzione delle cellule *target*, attivazione del processo infiammatorio.

Linfociti B memoria

Gli stadi successivi al secondo riarrangiamento della maturazione del linfocita B sono sotto il controllo dell'antigene, responsabile dell'attivazione dello stesso linfocita. L'attivazione può avvenire in modo dipendente o indipendente dai linfociti T e porta alla proliferazione e alla differenziazione dei linfociti B con conseguente generazione di plasmacellule e di linfociti B di memoria.

La generazione di B memoria offre due vantaggi. Innanzitutto, assicura la presenza di una popolazione che permane a lungo nell'organismo e che permette l'instaurarsi di una pronta risposta immunitaria, qualora l'organismo dovesse nuovamente confrontarsi con lo stesso antigene (risposta secondaria). In secondo luogo, la generazione dei B memoria è accompagnata da mutazioni somatiche puntiformi che possono contribuire così a migliorare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

I linfociti B memoria non esercitano costitutivamente una funzione effettrice e necessitano di una ristimolazione prima di poter partecipare attivamente alla risposta immunitaria. Tale sottopopolazione è costituita da cellule adattabili, che possono essere regolate a seconda dell'ambiente citochinico presente e della quantità di antigene circolante.

Tali cellule sono storicamente identificate per il fenotipo IgD⁻ segno caratteristico dell'avvenuto riarrangiamento somatico. Attualmente si tende a individuare come B memoria quelle cellule che esprimono il CD27, marcatore appartenente alla famiglia del recettore del TNF. L'espressione in membrana del CD27 è indotta nel momento in cui il linfocita B migra all'interno dei centri germinativi dei linfonodi per poi essere mantenuta anche in seguito.

I linfociti B memoria possono quindi essere riconosciuti in quelle cellule che esprimono CD27 in associazione a CD19, la prima molecola B-specifica a comparire sulla superficie delle cellule indirizzate lungo la linea B-linfocitaria,

che si mantiene durante tutte le fasi differenziative per essere persa soltanto a livello plasmacellulare.

CD27 sembrerebbe essere inoltre in grado di contribuire all'attivazione delle cellule B memoria, favorendo la differenziazione verso le plasmacellule.

Tolleranza immunitaria

La risposta immunitaria specifica è basata sulla generazione casuale di un vasto repertorio di TCR e di Ig con diverse specificità. La tolleranza verso il *self* può essere intesa come uno stato deficitario di tale sistema dovuto alla mancanza di specificità, dunque un deficit all'interno di questo complesso di riconoscimento.

Tale carenza è determinata da una mancata generazione delle specificità oppure da una loro delezione successiva.

La tolleranza immunologica risulta quindi essere una condizione in cui l'organismo non è in grado di sviluppare una risposta immunitaria nei confronti di uno specifico antigene *self* [1].

La definizione di ciò che è estraneo, ossia il *non self* si configura come un evento genetico che avviene accidentalmente e si verifica precocemente grazie al riarrangiamento dei geni codificanti per il TCR.

Al contrario la determinazione del *self*, come insieme di antigeni tollerati, non riconosciuti come estranei, appare come un evento epigenetico e avviene a livello del timo o in periferia.

Nel momento in cui i linfociti incontrano l'antigene si possono verificare tre condizioni: il linfocita viene attivato e ciò determina la risposta immune specifica; il linfocita viene inattivato o eliminato e ciò determina la tolleranza nei confronti di quell'antigene; l'antigene non induce alcuna risposta, né di tipo positivo, né di tipo negativo (ignoranza). Esistono due principali modalità di induzione della tolleranza: la tolleranza centrale e la tolleranza periferica.

Tolleranza centrale

La tolleranza centrale si realizza nel momento in cui i linfociti incontrano il rispettivo antigene durante il loro processo maturativo a livello degli organi linfatici centrali, ossia midollo osseo per i linfociti B e timo per i linfociti T. In tale situazione essi non vengono attivati, ma divengono tolleranti nei confronti di

quell'antigene. In generale gli antigeni presenti ad elevate concentrazioni a livello degli organi linfatici primari sono antigeni endogeni, in quanto quelli provenienti dall'ambiente esterno vengono riconosciuti dalle cellule dell'immunità naturale e trasportati dalle stesse verso gli organi linfatici secondari (milza, linfonodi, tessuti linfoidei delle mucose).

I linfociti immaturi che, durante il processo di sviluppo, risultano essere dotati di recettori ad alta affinità nei confronti degli antigeni *self* e dunque in grado di interagire con questi proprio a livello degli organi linfatici primari, vengono eliminati.

Questo processo di eliminazione o delezione consente di rimuovere la stragrande maggioranza dei cloni linfocitari reattivi nei confronti degli antigeni ubiquitari.

Dal momento che l'incontro tra un linfocita immaturo con il rispettivo antigene risulta nella sua delezione o comunque in un suo arresto funzionale, mentre l'incontro tra un linfocita maturo e l'antigene dà luogo ad attivazione, proliferazione e differenziazione funzionale, è verosimile che il riconoscimento dell'antigene determini segnali funzionali diversi nel linfocita immaturo rispetto a quello maturo.

La tolleranza centrale nei confronti dei linfociti T autoreattivi si verifica nel timo ed è classicamente conosciuta con il termine di selezione negativa. La selezione negativa è determinata principalmente dalla concentrazione dell'autoantigene a livello timico e dal grado di affinità per tale antigene da parte del recettore linfocitario T (*T cell receptor* – TCR).

I peptidi endogeni, in associazione con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, vengono presentati nel timo ai linfociti T immaturi doppiopositivi (CD4+CD8+). Solo nel caso in cui si verifichi una debole interazione con l'antigene, grazie ad una debole affinità del recettore con lo stesso, si ottiene la trasduzione di un segnale debole che risulta essere un segnale di sopravvivenza e proliferazione.

Se il TCR presenta un'affinità estremamente bassa per il peptide, non si avrà nessun segnale di trasduzione e la cellula andrà incontro ad apoptosi.

Viceversa, un TCR ad elevata affinità per il complesso peptide-MHC, determina l'attivazione di un processo di morte programmata o apoptotica, designata come

delezione clonale. Alternativamente, il linfocita T con TCR estremamente reattivo, può subire una conversione del proprio fenotipo verso la linea T regolatoria o *natural killer* oppure esprimere un nuovo recettore con una specificità diversa.

Tale processo interessa sia le cellule T ristrette per MHC di classe I che quelle ristrette per MHC di classe II e risulta quindi in uno stato di tolleranza sia a carico dei linfociti CD4⁺ che CD8⁺.

Come conseguenza nessuno dei linfociti T CD4⁺ o CD8⁺ maturi che lasciano il timo sarà più in grado di riconoscere gli antigeni *self* presenti a livello timico.

La tolleranza centrale nei confronti dei linfociti B autoreattivi si verifica nel midollo osseo attraverso la delezione dei linfociti B immaturi dotati di recettori ad elevata affinità per antigeni *self* presenti nel microambiente midollare.

Tale situazione si riscontra più frequentemente con antigeni multivalenti, quali le molecole di superficie o le molecole polimeriche come il DNA a doppia elica, che interagiscono con più recettori immunoglobulinici sulla stessa cellula B, determinando un segnale molto potente.

Il principale meccanismo di eliminazione dei linfociti B immaturi autoreattivi risulta essere l'induzione della morte apoptotica. In taluni casi, tuttavia, successivamente all'incontro con l'autoantigene, i linfociti B immaturi, anziché essere deleti, vanno incontro a riattivazione dei geni RAG-1 e RAG-2 acquisendo la capacità di esprimere una nuova catena leggera immunoglobulinica e di conseguenza una nuova specificità antigenica.

Tale meccanismo è stato definito revisione recettoriale ("*receptor editing*").

Tolleranza periferica

La tolleranza periferica è responsabile del mantenimento della tolleranza nei confronti degli antigeni *self* che non sono rappresentati a livello timico o midollare, ma sono invece espressi nei tessuti periferici. Esistono infatti numerosi cloni di linfociti maturi i quali, per essere sfuggiti al processo di selezione negativa a causa del mancato contatto con tali auto antigeni, sono potenzialmente autoreattivi.

Ciò nonostante, quando questi cloni incontrano il rispettivo antigene a livello periferico la loro risposta è impedita o fortemente regolata, suggerendo in tal

modo l'esistenza di meccanismi che consentono il mantenimento della tolleranza anche nei confronti degli antigeni endogeni presenti solo in periferia.

La tolleranza periferica nei confronti dei linfociti T autoreattivi può verificarsi attraverso quattro meccanismi principali. Tali meccanismi sono rappresentati da: anergia, delezione, soppressione, ignoranza.

Anergia indotta da riconoscimento di antigeni self

L'esposizione di cellule T CD4⁺ ad un antigene, in assenza di segnali di costimolazione o di cellule dell'immunità innata, può renderle incapaci di rispondere.

La piena attivazione delle cellule T richiede innanzitutto un segnale a partenza dal TCR e in secondo luogo il riconoscimento dei co-stimolatori, in particolare B7-1 e B7-2 presenti sulla cellula presentante, da parte di CD28.

La presenza del primo segnale, ma non del secondo, determina nel linfocita uno stato di non responsività funzionale, anziché uno stato di attivazione. Una segnalazione prolungata del solo TCR, dunque, può portare ad una condizione di anergia: questa situazione è plausibile per gli antigeni self che non generano immunità innata o forte co-stimolazione.

L'anergia è il risultato di alterazioni biochimiche o genetiche che riducono la capacità del linfocita di attuare una risposta immunitaria. Sono in effetti numerose le alterazioni biochimiche ritenute necessarie per mantenere questo stato di mancata risposta nei confronti degli antigeni *self*.

Le cellule T anergiche mostrano un blocco nella trasduzione del segnale del TCR, che sembrerebbe dovuto a volte ad una ridotta espressione del TCR, altre volte al reclutamento di molecole inibitorie quali le fosfatasi.

Gli antigeni endogeni potrebbero determinare l'attivazione di ubiquitina-ligasi cellulari, che potrebbero a loro volta ubiquitinare le proteine TCR associate portandole a degradazione a livello proteasomiale o lisosomiale.

Il risultato di tale processo sarebbe dunque una riduzione del segnale del TCR. Il linfocita T autoreattivo potrebbe, nel momento dell'interazione con l'antigene *self*, reclutare i recettori inibitori della famiglia di CD28, le cui funzioni consistono nel determinare l'esaurimento della risposta. I due recettori il cui ruolo nella tolleranza del *self* è meglio descritto, sono CTLA-4 e PD-1.

In particolare CTLA-4 compete con CD28 per il legame alle molecole co-stimolatorie della famiglia B7, escludendo CD28 dalla sinapsi immunitaria, e dunque dal sito di riconoscimento dell'antigene. Risulta essere inoltre in grado di trasmettere segnali inibitori che si contrappongono ai segnali attivanti il TCR.

I topi con gene per il CTLA-4 soppresso, sviluppano infatti, una patologia autoimmune caratterizzata da infiltrati T-cellulari a livello tissutale e associata a linfoproliferazione massiva. Nell'uomo, polimorfismi del gene per CTLA-4, risultano essere associati ad alcune patologie endocrine autoimmuni.

Anticorpi monoclonali come CTLA-4 Ig, diretti contro il sito di legame B7/CD28, determinano l'instaurarsi di una condizione di anergia clonale, che può essere sfruttata nel campo del trapianto allogenico di midollo osseo, nei casi di profonda disparità di corredo HLA tra donatore e ricevente [4].

PD-1 riconosce invece due ligandi espressi sulle APC e su altre cellule, determinando, grazie a tale riconoscimento, l'inattivazione del linfocita T.

Un ulteriore meccanismo di anergia si verifica in quelle situazioni nelle quali il linfocita T maturo interagisce con una APC dotata di molecole co-stimolatorie, ma che presenta un peptide con residui aminoacidici alterati nella regione di contatto con il TCR. Tali antigeni mutati vengono denominati antagonisti peptidici ed appartengono alla categoria dei ligandi peptidici alterati. In questa evenienza la cellula T riceve un secondo segnale normale, ma un primo segnale anormale. I meccanismi biochimici coinvolti in questa forma di anergia sono poco noti e non è ancora chiaro se essa si verifichi nell'organismo in condizioni fisiologiche.

Le cellule dendritiche residenti negli organi linfoidi e non linfoidi risultano inoltre rivestire un ruolo decisivo nel mantenimento della tolleranza periferica.

Le cellule dendritiche tissutali si trovano normalmente in uno stato di riposo ed esprimono livelli bassi o nulli di molecole co-stimolatorie. Tuttavia in virtù della loro costante attività di presentazione degli antigeni *self* in assenza di segnali attivatori, permettono l'instaurarsi di uno stato di anergia nelle cellule T con le quali interagiscono.

Soppressione dei linfociti autoreattivi da parte delle cellule T regolatrici

Sebbene in passato diverse linee cellulari siano state proposte come “soppressori dell’immunità”, solo attorno alla metà degli anni 90’ sono stati identificati i linfociti T regolatori [5].

La maggior parte delle cellule T regolatrici esprimono alti livelli di recettore per IL-2 e CD25, ma non altri *markers* di attivazione.

Queste cellule sono generate principalmente per riconoscimento del *self* nel timo, ma si sviluppano occasionalmente anche in periferia. La genesi e la sopravvivenza di tali linfociti è dipendente dalle citochine TGF- β e IL-2 e dalla costimolazione B7/CD28. Un fattore di trascrizione chiamato Foxp3 è critico per lo sviluppo e la funzionalità della maggior parte di queste cellule.

Un meccanismo di controllo della risposta immunitaria consiste nella secrezione della citochina immunosoppressiva IL-10, che inibisce la funzione di macrofagi e cellule dendritiche. Altri esperimenti indicano che le cellule T regolatrici, interagiscono con un contatto di tipo diretto con le APC o con i linfociti rispondenti.

Delezione dei linfociti T per apoptosi

La delezione clonale dei linfociti T maturi si verifica in genere in seguito alla persistente stimolazione antigenica e risulta in un processo noto come morte cellulare indotta dall’attivazione (“*activation-induced cell death*” – AICD).

Tale meccanismo sembrerebbe essere cruciale in campo trapiantologico, ai fini del mantenimento della tolleranza periferica [6].

La morte apoptotica può avvenire secondo due vie biochimiche: via recettoriale e via mitocondriale. I linfociti T che riconoscono il *self* in assenza di costimolazione o di una risposta innata di accompagnamento possono attivare la proteina pro-apoptotica Bim, imboccando così la via mitocondriale.

Nelle normali risposte linfocitarie i segnali a partenza dal TCR stimolano l’espressione di proteine anti-apoptotiche della famiglia di Bcl-2, in grado di promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Bim viene attivata dal riconoscimento del *self* in assenza di costimolazione o di fattori di crescita; come conseguenza di ciò, induce a sua volta l’attivazione di proteine effettrici che determinano la morte programmata.

In assenza di forte stimolazione linfocitaria, non vengono prodotti fattori di crescita e gli effetti di Bim non possono essere bilanciati da proteine anti-apoptotiche.

La AICD è una forma di apoptosi indotta da segnali che originano da recettori “di morte” presenti sulla membrana, il più importante dei quali è Fas. Il ligando del Fas (FasL), interagendo con Fas, determina l’attivazione di una serie di cistino-proteasi intracellulari, chiamate caspasi, che provocano la morte apoptotica della cellula. Le cellule in apoptosi vengono rapidamente rimosse dai fagociti. In questa situazione non può verificarsi quindi l’induzione di fenomeni infiammatori.

L’effetto finale risulta essere una delezione dei linfociti T specifici per l’antigene che ha provocato la loro stimolazione ripetuta. La AICD mediata dalla interazione Fas/FasL è infatti potenziata dalla presenza di elevate concentrazioni di IL-2, il principale fattore di crescita dei linfociti T. A conferma di quanto detto sopra, va rilevato che sia i topi deficienti in Fas o con mutazioni a livello di Fas-L, sia quelli deficienti in IL-2, sviluppano spontaneamente malattie autoimmuni. È verosimile dunque che la tolleranza immunologica basata sulla AICD si espliciti prevalentemente nei confronti di antigeni self periferici che attivano frequentemente i linfociti T. Si ritiene, infatti, che gli autoantigeni presenti in concentrazioni elevate a livello periferico, provochino ripetute e persistenti stimolazioni delle cellule T autoreattive, portando infine alla loro eliminazione tramite apoptosi Fas mediata.

Ignoranza clonale/ Sequestro di antigeni

L’ignoranza clonale rappresenta un’ulteriore modalità di mantenimento della tolleranza basata sulla incapacità di linfociti autoreattivi di rispondere ad antigeni self, senza che essi vadano incontro a morte apoptotica o diventino anergici. Tale modalità si estrinseca di solito nei confronti degli antigeni self presenti in siti anatomici inaccessibili (occhio, sistema nervoso centrale, testicolo), in quanto non in diretto contatto con la circolazione ematica o linfatica.

Un meccanismo di questo genere può verificarsi anche nei confronti di antigeni apparentemente accessibili ai linfociti. Il motivo per cui alcuni linfociti T maturi incontrando l’antigene specifico diventino anergici, mentre altri tendano

semplicemente ad ignorarlo, è tuttora sconosciuto. Una possibile spiegazione è che gli antigeni presenti ad elevata concentrazione inducano anergia clonale, mentre quelli presenti a concentrazioni molto ridotte in assenza del secondo segnale vengano ignorati.

La tolleranza periferica nei confronti dei linfociti B si verifica essenzialmente quando, come conseguenza dell'assenza del linfocita T "*helper*" specifico, il linfocita B maturo autoreattivo entrato in contatto con l'autoantigene nei tessuti periferici, diviene funzionalmente incapace di rispondere all'antigene, oppure viene addirittura escluso dai follicoli linfatici.

Il meccanismo di esclusione follicolare può essere rappresentato dalla perdita dei recettori per le chemochine, che normalmente attraggono i linfociti B maturi all'interno dei follicoli. Probabilmente il riconoscimento cronico dell'antigene porta alla ridotta espressione del recettore CXCR5 per le chemochine.

Le cellule escluse dai follicoli non ricevono i segnali sufficienti per sopravvivere e vanno incontro a morte cellulare.

L'interazione di una cellula B anergica con un linfocita T *helper* antigene-specifico, determina l'induzione della morte apoptotica tramite il legame tra il Fas-ligando dei linfociti T e il recettore Fas della cellula B.

Si sospetta che molte malattie causate da anticorpi diretti contro il *self* siano legate al fallimento della tolleranza mediata dai linfociti B.

Normalmente, non si rileva produzione di autoanticorpi ad alta affinità contro antigeni *self*, e questo potrebbe essere legato alla delezione o alla tolleranza degli *helper* anche in presenza di linfociti B funzionanti. In questi casi difetti nel mantenimento della tolleranza T possono risultare nella produzione di autoanticorpi.

Linfociti T regolatori

È noto da tempo ormai, all'interno della comunità scientifica che, tra gli innumerevoli meccanismi responsabili del mantenimento della tolleranza, un ruolo di primaria importanza sia svolto da una popolazione di cellule T con funzione di soppressione della risposta immunitaria rivolta verso antigeni *self* e *non self*. L'evidenza che una sottopopolazione di linfociti T, differente dalla

popolazione *helper*, fosse in grado di determinare una *down*-regolazione della risposta immunitaria risale agli anni '70, grazie agli studi di Gershon e Kondo [7].

I linfociti T identificati inizialmente come T soppressori vennero intensamente studiati negli anni successivi in molteplici campi dell'immunologia.

Successivamente si venne a conoscenza di come le cellule T regolatrici (T_{REG}) secernenti IL-10 potessero essere ottenute *in vitro* grazie alla stimolazione di cellule T *naive* con IL-10 o TGF- β prodotto dagli stessi linfociti T regolatori.

Divenne dunque comunemente accetta l'idea che a livello periferico coesistessero due popolazioni T linfocitarie CD4 positive, una potenzialmente capace di mediare patologie autoimmuni e l'altra in grado di inibirne l'esordio [8].

Da tali considerazioni derivò la necessità di individuare delle molecole di superficie che permettessero di distinguere le due popolazioni. A tal proposito venne identificata la catena α del recettore per IL-2, denominata CD25, presente sul 5-10% delle cellule CD4⁺ periferiche. Nel 1995, Sakaguchi et al. descrissero infatti una sottopopolazione di cellule T CD4⁺ con elevata espressione sulla superficie cellulare della catena alfa del recettore per l'IL-2 (CD25), la cui deplezione nel topo causava malattie autoimmuni e risposte aumentate agli antigeni esterni [9-10].

È altresì condiviso che IL-2 sia un fattore di crescita e di sopravvivenza di vitale importanza per il mantenimento della popolazione regolatrice.

In aggiunta al CD25, le cellule T regolatrici esprimono costitutivamente altre molecole di superficie quali CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene*), CD103 (integrina $\alpha E\beta 7$), CD45RO (fenotipo di cellule T della memoria) e CD62L; mentre tipicamente esprimono bassi livelli di CD127. Tuttavia, così come per il CD25, tali *marker* di superficie non sono specifici per le cellule T_{REG}, in quanto espressi anche da cellule T effettrici attivate e da altri tipi cellulari non appartenenti alla linea T. Infine il grado di maturazione delle cellule T_{REG} determina l'espressione di due differenti *marker* di superficie, CD45RO⁺ o CD45RA⁺. La maggior parte delle cellule T_{REG} matura a livello timico e rapidamente raggiunge una memoria immunitaria acquisendo un fenotipo CD45RO⁺. Un piccolo numero di cellule T_{REG} permane, invece, allo stato di

cellula “naive”. Queste cellule risulteranno CD45RA⁺ e andranno a costituire la popolazione di linfociti T_{REG} immaturi, naturali, migrati recentemente dal timo e caratterizzati comunque da un normale potenziale soppressivo [11].

Si può affermare che le cellule T regolatrici siano contraddistinte dalla loro capacità di proliferare in presenza di elevate concentrazioni di IL-2 come conseguenza della stimolazione del TCR, dall’incapacità di produrre IL-2 successivamente alla stimolazione e dalla scarsa risposta proliferativa *in vitro* conseguentemente all’interazione antigenica.

Recentemente è stata identificata un’ulteriore molecola di membrana, detta LAG-3, che sembrerebbe espressa selettivamente sui T_{REG} e che potrebbe essere coinvolta nell’espletamento della loro funzione soppressiva, ulteriori studi sono tuttavia necessari per chiarirne il ruolo.

Ad oggi sono state riconosciute diverse sottopopolazioni di cellule T regolatorie, la cui caratteristica comune è la capacità di sopprimere l’attivazione, la proliferazione, la differenziazione e le funzioni di molte cellule effettrici: linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, linfociti B, cellule NK e NKT, cellule dendritiche.

Una pietra miliare nella ricerca in tema di T regolatori è stata l’identificazione nel 2001 del fattore di trascrizione denominato Foxp3 e il suo riconoscimento come fattore essenziale per lo sviluppo e la funzione dei linfociti T regolatori.

I linfociti T periferici CD4⁺, CD25⁺ e i timociti CD25⁺ CD4⁺ CD8⁻ esprimono Foxp3, l’attivazione dei linfociti CD4⁺ CD25⁻ al contrario, non esita nell’espressione di tale fattore trascrizionale.

Le evidenze circa l’attività immunomodulante dei linfociti regolatori Foxp3⁺ sono altresì sostenute dall’insorgenza di una patologia autoimmune, denominata IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*), di IBD (*inflammatory bowel disease*) e allergia come conseguenza di mutazioni del gene codificante per lo stesso fattore [12].

Foxp3 risulta essere in grado di attivare o inibire centinaia di geni direttamente o indirettamente, tramite la formazione di un complesso di trascrizione associandosi con altri fattori come NF-AT, AML1 o Runx 1 [13-14].

È stato dimostrato come multipli meccanismi di soppressione siano in realtà mediati da T regolatori Foxp3. In effetti l’inibizione dell’attivazione e

proliferazione dei linfociti T dipendente dal contatto cellula-cellula, la distruzione o l'inattivazione delle cellule T o delle APC e la soppressione tramite la secrezione di citochine come IL-10, IL-35, TGF- β risultano essere tutti meccanismi dipendenti dalla funzione della popolazione regolatrice [15-16].

La differenziazione in T regolatore è determinata a livello del timo dall'interazione di una cellula T con un ligando di origine *self* ad alta affinità. Conseguentemente a tale incontro si attiva una cascata di segnalazione intracellulare che induce l'espressione del Foxp3 [7].

L'espressione del Foxp3 determinerà successivamente lo sviluppo verso la linea T regolatoria. I precisi meccanismi con i quali avviene questa differenziazione e selezione sono ancora da chiarire, ma sembrerebbe che Foxp3 possa non essere inizialmente necessario per l'evoluzione verso la linea regolatrice. In assenza di Foxp3 alcuni timociti sembrerebbero in grado di acquisire in parte un fenotipo regolatore, senza che peraltro siano in grado di esercitare l'attività soppressiva [18].

Sembrerebbe inoltre che parte delle caratteristiche delle cellule T regolatrici siano indipendenti dalla presenza del Foxp3: una quota dell'attività immunoregolatrice potrebbe infatti essere indipendente dall'espressione del Foxp3 [19].

Non è inoltre da trascurare la possibilità delle cellule T *naive* di differenziare verso il fenotipo regolatore a livello periferico grazie all'induzione dell'espressione di Foxp3. Tale situazione si presenta *in vitro* successivamente alla stimolazione con TGF- β e *in vivo* in qualsiasi condizione che implichi una stimolazione antigenica cronica sub ottimale o la presentazione antigenica da parte delle cellule dendritiche [20].

Le cellule dendritiche (DC) mature sono in grado di indurre la proliferazione dei T regolatori Foxp3⁺ tramite l'interazione CD80-CD86 [21-22]. La secrezione di IL-6 da parte delle DC attivate permette alle cellule T effettrici, responsive alla stimolazione antigenica, di resistere all'azione immunomodulante esercitata dai T regolatori [23].

La differenziazione dei linfociti T *naive* verso la linea regolatrice è mediata dalla contemporanea presenza, nel microambiente, di TGF- β ; al contrario la

stimolazione delle stesse con IL-6 e TGF- β determina l'evoluzione verso la linea linfocitaria T *helper* 17 [24-25].

È dunque intuibile come la diversa composizione di citochine e molecole co-stimolatrici secrete da parte delle APC e di altre cellule T sia cruciale per il controllo della maturazione, differenziazione e funzione dei linfociti T regolatori.

Le cellule T regolatrici possono quindi essere definite come una sottopopolazione linfocitaria coinvolta nel mantenimento della tolleranza periferica verso il *self*, così come nella *down*-regolazione della risposta immune verso antigeni estranei all'organismo. L'espletamento delle funzioni regolatrici dei linfociti T CD4⁺CD25⁺ permette di prevenire la precipitazione di processi autoimmuni nei confronti di innumerevoli tessuti, è coinvolto nella risposta immunitaria nei confronti di cellule tumorali ed appare fondamentale nell'induzione e mantenimento della tolleranza in ambito trapiantologico.

L'infiltrazione di cellule Foxp3⁺ in organi trapiantati correla infatti, con uno stato di tolleranza operativa nei confronti del *graft* [26].

Sottopopolazioni linfocitarie T_{REG}

I linfociti T_{REG}, costituenti approssimativamente il 5-10% delle cellule T CD4⁺ circolanti in periferia, non possono essere considerati una popolazione uniforme, in quanto derivanti da due sottopopolazioni cellulari differenti. Si distingue dunque, una sottopopolazione nT_{REG} (*natural* T_{REG} cells) di origine timica ed una sottopopolazione iT_{REG} (*induced* T_{REG} cells), derivante dalla conversione periferica di cellule T effettrici [27].

Le cellule nT_{REG} e iT_{REG} mostrano alcune caratteristiche comuni in termini di fenotipo e funzione; esprimono entrambe Foxp3 ed entrambe sopprimono la proliferazione dei T effettrici.

La stimolazione del TCR è fondamentale per l'induzione sia dei nT_{REG} che dei iT_{REG} e la presenza di citochine come TGF- β e IL-2 è necessaria sia a livello intratimico per lo sviluppo dei nT_{REG} che a livello periferico per lo sviluppo dei iT_{REG}.

La regione promotrice di Foxp3 possiede, infatti, siti di legame per le proteine SMAD e STAR5 coinvolte rispettivamente nelle vie di segnalazione di TGF- β e IL-2.

Le cellule nT_{REG} vengono selezionate grazie ad una interazione tra il recettore delle cellule T in fase di maturazione (TCR) ed antigeni associati a molecole MHC di classe II dalle cellule dello stroma timico, nei corpuscoli di Hassal. L'avidità di questo legame, che deve essere sufficientemente alta da garantire la sopravvivenza delle cellule T, ma non tanto da indurre delezione clonale, e la presenza di molecole accessorie quali CD28, B7 e CD40, sono fondamentali per il differenziamento di tali cellule T verso un fenotipo regolatore. I linfociti iT_{REG} invece, deriverebbero da una conversione, a livello periferico, di cellule T CD4⁺CD25⁻ mature. La conversione avverrebbe in condizioni di stimolazione antigenica sub-ottimale come l'esposizione continua a basse dosi di antigene. Tale sottopopolazione linfocitaria inoltre, presenterebbe un repertorio TCR sostanzialmente paragonabile a quello delle cellule T effettrici da cui derivano.

Nonostante le cellule nT_{REG} siano selezionate nel timo da antigeni self, in ragione dell'espressione di un repertorio TCR diretto verso specificità dell'organismo, esse possono essere considerate come maggiormente dirette verso antigeni non self.

La differente specificità del repertorio TCR risulta notevolmente importante in campo trapiantologico, dove la tolleranza è sostanzialmente definita dalle specificità antigeniche del donatore [28].

Molti fattori sono in grado di facilitare l'induzione dei linfociti iT_{REG}, come l'acido retinoico [29], il LIF (*leukemia inhibitory factor*) [30], il CTLA-4, PD-1 (*programmed death-1*), PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) [31]. La conversione può essere inoltre inibita dall'interazione con molteplici molecole, tra cui si ritrovano alcune citochine (d'esempio IL-4, IL-6, INF- γ) e OX40 [32], dalla costimolazione da parte di TIM-1 (*T cell-Ig domain and mucin domain protein 1*), dall'attivazione della via di Akt-m-TOR [33-34].

È interessante notare come questi *pathway* abbiano uno scarso effetto a livello intratimico nell'indurre lo sviluppo dei nT_{REG}.

I T_{REG} originati a livello periferico risultano essere particolarmente instabili per la maggior tendenza a perdere l'espressione del Foxp3, rispetto ai nT_{REG}, probabilmente a causa di differenze epigenetiche a livello del gene codificante il

Foxp3 [35]. Tali differenze potrebbero essere rilevanti nella manipolazione selettiva delle due sottopopolazioni di T_{REG} in ambito terapeutico.

Con poche eccezioni, la conversione periferica da T effettore a T_{REG} potrebbe essere, *in vivo*, sorprendentemente rara [36]. Non è ancora stato chiarito inoltre, quale sia il contributo dei T_{REG} derivanti dal timo e di quelli originati in periferia nella costituzione del *pool* totale periferico dei T_{REG}. Se nT_{REG} e iT_{REG} agiscono sinergicamente nell'indurre la tolleranza o siano sottopopolazioni cellulari meramente ridondanti, non è ancora definito.

È dimostrato, tramite studi *in vitro* e *in vivo*, che nT_{REG} e iT_{REG} hanno la stessa efficacia nella soppressione delle cellule T effettrici.

Il fattore di trascrizione Foxp3 (forkhead box protein 3)

La ricerca di un marcatore che potesse identificare con certezza le cellule T-REG ha portato all'individuazione, in modelli murini, di un fattore di trascrizione, chiamato Foxp3, specificamente espresso dalle cellule regolatrici CD4⁺CD25⁺. Il gene *Foxp3* e la sua corrispondente proteina, chiamata scurfina, erano già noti poiché una loro mutazione è alla base della sindrome umana chiamata IPEX, una rara immunodeficienza legata al cromosoma X caratterizzata da disordini autoimmunitari a carico di numerose ghiandole endocrine, malattie infiammatorie intestinali, dermatite atopica ed infezioni fatali.

Tuttavia, mentre l'espressione di Foxp3 appare una prerogativa esclusiva delle T-REG nel topo, lo stesso non può essere affermato nell'uomo, in cui Foxp3 può essere espresso temporaneamente nei linfociti T attivati indipendentemente dalla funzione regolatoria. Nonostante tutto, Foxp3 continua ad essere considerato il marker maggiormente specifico della linea regolatoria.

In conclusione, sebbene nessuno dei marcatori ad oggi disponibili sia esclusivo delle cellule T-REG, la loro presenza contemporanea ed il loro livello di espressione li rende il migliore strumento per identificare fenotipicamente questa popolazione cellulare. La metodica più affidabile per valutarne l'azione è costituita dagli studi funzionali.

Foxp3 (*Forkhead BOX protein 3*) è una proteina di 431 aminoacidi, appartenente alla famiglia dei regolatori trascrizionali Fox. Dal punto di vista strutturale, presenta un dominio di legame per il DNA del tipo *forkhead-winged/helix* (FKH)

all'estremità C-terminale, un dominio C2H2 *zink finger*, un dominio *leucine zipper* e una regione N-terminale ricca in prolina, coinvolta nella inibizione della trascrizione dei geni bersaglio. FOXP3 infatti, si localizza a livello del nucleo dove agisce come repressore della trascrizione di geni codificanti per alcune citochine espresse dai linfociti T.

Studi recenti hanno mostrato come questo fattore riconosca una sequenza di DNA in prossimità del sito di legame del fattore NF-AT che attiva la trascrizione di geni codificanti per molte citochine infiammatorie, fra le quali IL-2, IL-4 e TNF α . Si ritiene che la proteina Foxp3 competa per il sito di legame al DNA con NF-AT portando all'inibizione della trascrizione dei geni per le suddette citochine.

Studi effettuati su modello murino (topo *scurfy*), relativamente alla sindrome IPEX, hanno mostrato che le manifestazioni cliniche della patologia sono associate alla disfunzione delle cellule T-REG e che Foxp3 svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella funzione di tali tipi cellulari. La presenza di un' inserzione a livello dell'esone 8 del Foxp3, nel topo *scurfy*, determina la formazione di un prodotto proteico mancante del dominio FKH. Tale mutazione comporta l'incapacità della proteina di legare il DNA ed è associata all'assenza delle cellule T-REG e alla conseguente mancanza di *down-regolazione* delle cellule T effettrici.

Foxp3 è espresso prevalentemente dai linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁺ ma anche da altre cellule CD4⁺, CD8⁺ e raramente anche da cellule CD4⁻ CD8⁻ [37].

Solo una percentuale inferiore al 5% di cellule CD4⁺CD25⁻ esprime Foxp3 [38], mentre si ritrova sul 95,7% dei linfociti T-REG presenti in periferia [39].

L'espressione del Foxp3 nei *natural* T-REG può essere persa, comportando una perdita della capacità immunosoppressiva e potenzialmente l'acquisizione di funzioni effettrici [40].

Inoltre nonostante Foxp3 sia determinante per lo sviluppo dei T-REG, la sua espressione non è del tipo "tutto o nulla". Differenti livelli di prodotto proteico influenzano profondamente la capacità soppressiva con riduzione della funzione regolatrice alla diminuzione della quantità disponibile di Foxp3 [41].

Numerosi studi hanno dimostrato l'instabilità dei T_{REG}. La stimolazione di T_{REG} *in vitro*, in presenza di IL-6, comporta la perdita dell'espressione di Foxp3 e le stesse cellule possono diventare linfociti T effettori secernenti IL-17 [42].

Nel 2009 Bluestone et al. dimostrarono che esiste una frazione di T_{REG} non in grado di mantenere l'espressione del Foxp3, capaci di secernere una quota importante di INF- γ e di mediare lo sviluppo del diabete mellito autoimmune [43]. Nonostante non siano ancora conosciuti tutti i fattori coinvolti nella regolazione della stabilità dei T_{REG}, alcune citochine infiammatorie (come IL-1, IL-6, TNF) e molecole di costimolazione (come OX40, Tim-1) sembrerebbero essere coinvolte nel processo.

La metilazione e l'acetilazione degli istoni, lo stato delle isole CpG così come quello dei miRNA risultano essere notevolmente coinvolti nei meccanismi di regolazione della stabilità dei T_{REG} [44].

I T_{REG} originati in periferia mostrano caratteristiche epigenetiche simili a quelle dei T effettori. Tale condizione potrebbe rappresentare una delle motivazioni per cui questa sottopopolazione appare così instabile e spiegare la scarsa rappresentatività della stessa nel pool periferico totale dei T_{REG} in pazienti trapiantati in condizioni di tolleranza.

Meccanismo d'azione delle cellule T regolatrici

La funzione regolatrice ed immunomodulante può essere espletata dai T_{REG} attraverso differenti modalità. Tali modalità rientrano all'interno di quattro modelli d'azione: soppressione mediante citochine inibitorie, soppressione tramite citolisi, soppressione mediante alterazioni metaboliche, soppressione tramite modulazione della maturazione o funzione delle cellule dendritiche (DC).

La soppressione tramite citochine inibitorie, come IL-10 e TGF- β , è uno dei meccanismi d'azione sui quali si è maggiormente concentrata l'attenzione.

Di grande interesse è inoltre la capacità di queste citochine di indurre in periferia, la conversione da Th CD4⁺ a iT_{REG}.

Nonostante l'importanza di IL-10 e TGF- β , quali mediatori soppressivi, sia indiscussa, il loro contributo alla funzione dei nT_{REG} è ancora dibattuto.

L'utilizzo, in studi *in vitro*, di anticorpi neutralizzanti o cellule T incapaci di produrre o rispondere a queste citochine, ha suggerito che IL-10 e TGF- β potrebbero non essere essenziali per l'espletamento della funzione dei T_{REG}.

In modelli di asma ed allergia appare evidente come sia nT_{REG} che iT_{REG} esplicino le loro funzioni di controllo delle manifestazioni patologiche con un meccanismo IL-10 e TGF- β dipendente.

TGF- β può inoltre, essere in grado di mediare la soppressione tramite un meccanismo di contatto cellula-cellula quando legato alla membrana.

Recentemente, un'ulteriore citochina inibitoria, identificata nell'IL-35, è stata riconosciuta come preferenzialmente espressa dai T_{REG} e necessaria per l'attuazione della massima risposta regolatoria.

La soppressione dipendente da citolisi è mediata dalla secrezione di granzima. *Granzyme-A* e perforine, in particolare, sono responsabili dell'uccisione delle cellule *target*.

L'affermazione che i T_{REG} possiedano attività citolitica è supportata da studi che mostrano come questi siano in grado di determinare la morte dei linfociti B tramite la secrezione di *granzyme-B* e in parte di perforine [45]. Più di recente è stato dimostrato come i T_{REG} possano sopprimere l'attività di eliminazione di cellule tumorali svolta da cellule NK e da linfociti T citotossici CD8⁺ mediante meccanismi dipendenti da granzima-B e perforine [46].

Per quanto riguarda la terza modalità d'azione dei T_{REG}, ovvero la soppressione ottenuta con l'induzione di disordini metabolici nei T effettori, diversi meccanismi sono stati proposti.

È da tempo dibattuto se l'elevata espressione del CD25 sulla membrana da parte dei T_{REG} sia responsabile della deplezione locale di IL-2 necessaria per la sopravvivenza dei T effettori. È dunque da chiarire se i T_{REG} possano indurre apoptosi tramite un meccanismo mediato dalla deprivazione di citochine.

Due modalità di soppressione recentemente proposte coinvolgono il rilascio intracellulare ed extracellulare di adenosina. È stato dimostrato che l'espressione concomitante di CD39 e CD73 genera adenosina pericellulare che a sua volta sopprime la funzione dei T effettori attivando il recettore A2A per l'adenosina. Il legame dell'adenosina a tale recettore sembrerebbe non solo inibire l'attività delle

cellule T effettrici ma anche potenziare la produzione di iT_{REG} ostacolando l'espressione dell'IL-6 e promuovendo invece la secrezione di TGF- β [47].

È stato inoltre provato come l'adenosina sia in grado di modulare la maturazione delle DC favorendo l'espressione di un fenotipo di tolleranza.

L'IL-6 inibisce la generazione di T_{REG} e promuove invece lo sviluppo di cellule Th17 pro-infiammatorie [48]. Appare dunque evidente come l'inibizione della secrezione di IL-6 sia di fondamentale importanza per il mantenimento del *pool* di T_{REG}.

È stata ulteriormente dimostrata la capacità dei T_{REG} di sopprimere la funzione dei T effettori per via diretta, grazie al trasferimento dell'AMP ciclico tramite le GAP junction presenti a livello della membrana [49].

Oltre alla via diretta di modulazione della funzionalità dei T effettori, è riconosciuta una via indiretta di regolazione della stessa grazie all'interazione dei T_{REG} con il processo maturazione delle DC, la cui funzione è richiesta per l'attivazione delle cellule T effettrici. È stato provato come le cellule T_{REG} siano in grado di indurre le cellule dendritiche ad esprimere il gene codificante per IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*), tramite un meccanismo dipendente dall'interazione tra CTLA-4 e CD80 e/o CD86. IDO è un enzima della via di degradazione del triptofano che determina la produzione di metaboliti pro-apoptotici responsabili della soppressione dei T effettori [50-51].

Numerosi studi hanno inoltre suggerito che i T_{REG} agiscano modulando negativamente la funzione delle DC di attivazione dei T effettori.

Ivars et al. furono i primi a riportare la capacità dei T_{REG} di *down*-regolare l'espressione delle molecole di co-stimolazione CD80 e CD86 sulla superficie delle DC in vitro [52].

È stata inoltre indicata da studi effettuati con cellule T_{REG} umane, la potenzialità delle T_{REG} stesse di modulare la funzione dei monociti e macrofagi. Nonostante il preciso meccanismo rimanga poco chiaro, la modulazione potrebbe essere mediata da molecole di superficie come CTLA-4 e/o citochine come IL-10 e TGF- β .

Di recente è stato inoltre suggerito che la maturazione delle DC possa essere interrotta da una molecola omologa del CD4 denominata LAG3 (*lymphocyte-*

activation gene 3) o CD223. LAG3 lega le molecole MHC di classe II, possiede un'attività intrinseca di regolazione negativa della funzione delle cellule T ed è richiesta per l'espletamento delle funzioni di soppressione delle T_{REG} [53]. Il legame di LAG3 a molecole di MHC di classe II espresse da DC immature induce un *pathway* di segnalazione inibitorio mediato da una sequenza ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). La via di segnalazione attivata coinvolge FcγRγ e il reclutamento, ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) mediato, della proteina tirosin-fosfatasi 1 (SHP1) contenente un dominio SH2. Tale cascata esita infine nella soppressione della maturazione e delle funzioni immunomodulatrici delle DC.

Le cellule T_{REG} possono inoltre influenzare la risposta immunitaria modulando il reclutamento di altre cellule oltre alle DC. È stato provato che le T_{REG} sono in grado di reclutare ed attivare i mastociti, cellule essenziali per lo sviluppo della tolleranza periferica nei confronti di un organo trapiantato.

Localizzazione dei T_{REG}

I T_{REG} possono essere localizzati, oltre che nelle stazioni linfonodali, anche in numerosi altri tessuti extralinfoidi. Ad esempio i T_{REG} presenti a livello del tessuto adiposo sembrerebbero intervenire nella regolazione dei processi metabolici.

I T_{REG} si localizzano inoltre in quegli organi trapiantati verso i quali viene raggiunto uno stato di tolleranza [54].

In molteplici modelli di risposta immune, l'induzione del rigetto T-mediato avviene a livello dei linfonodi. I T_{REG} possono successivamente migrare nell'organo trapiantato dove svolgono un ruolo chiave nel controllo dell'infiammazione *intra-graft*, meccanismo che perpetua la generazione di altri T_{REG} *in situ*.

Nel 2009 venne dimostrata da Bromberg et al. la migrazione sequenziale dei T_{REG} dal circolo sanguigno all'organo trapiantato e successivamente ai linfonodi drenanti, come fenomeno necessario per il raggiungimento della tolleranza [55].

I linfociti B regolatori

Studi effettuati sia in modelli murini che umani hanno dimostrato la presenza di una sottopopolazione di cellule B secernenti IL-10 e TGF- β , con attività immunomodulante.

È recentemente emerso che tale sottopopolazione di cellule B regolatrici (B_{REG}) potrebbe svolgere un ruolo nell'indebolimento della risposta immunitaria, soprattutto nel caso di modelli murini. La funzione regolatrice delle cellule B nelle patologie autoimmuni è stata riportata in prima istanza da Janeway e collaboratori in un modello murino sperimentale di encefalomielite [56]. In altri lavori è stato dimostrato come la stimolazione di cellule B implicate nell'insorgenza dell'artrite reumatoide, con anti-CD40 e collagene abbia permesso l'induzione di cellule B tollerogene secernenti IL-10 [57].

Nonostante le conoscenze sui linfociti B regolatori siano limitate, è possibile supporre che esse siano in qualche modo in grado di intervenire nel mantenimento della tolleranza verso il trapianto.

Linfociti B capaci di regolare la funzione delle cellule T vennero originariamente descritti da Shimamura e collaboratori [58-60]. Successivamente Wolf [61] osservò come topi deficitari per le cellule B fossero incapaci di guarire da encefalomielite sperimentalmente indotta. In seguito venne dimostrata l'azione immunosoppressiva dei B regolatori in modelli murini di colite, artrite ed encefalomielite [62-63].

La prima sottopopolazione di cellule B_{REG} identificata risultò essere caratterizzata dall'espressione di CD19 e CD25 e dalla produzione di elevati livelli di immunoglobuline, se confrontata con i linfociti B CD19⁺CD25⁻. Tale *subset* di cellule B, incapaci di secernere le immunoglobuline prodotte, venne riconosciuta come una popolazione di cellule B memoria CD27⁺, esprimenti elevati livelli di molecole co-stimolatorie. Venne inoltre dimostrata la capacità di questa popolazione di secernere IL-10 e la loro maggior efficienza nella stimolazione delle cellule T CD4⁺ rispetto alle cellule B CD25⁻ [64].

Si dimostrò inoltre il coinvolgimento di questa popolazione, altamente sensibile alla stimolazione mediata dall'IL-2, nei processi autoimmuni e venne suggerita una potenziale funzione di regolazione di tale risposta [65].

Successivamente venne riscontrato un livello elevato di cellule B CD19⁺CD25^{high} in pazienti affetti da vasculiti ANCA-correlate.

In molti studi la produzione di IL-10 risulta essere condizione indispensabile per poter definire i linfociti B come cellule regolatrici nei modelli murini. La presenza di cellule B secernenti IL-10 è stata dimostrata anche nel sangue periferico di soggetti sani [66].

La produzione di IL-10 può essere osservata approssimativamente nello 0,6-5% delle cellule B periferiche stimulate dal legame con *toll-like receptor* in combinazione con CD40 [67].

I linfociti B umani, attivati mediante la via di co-stimolazione dipendente dal CD40, hanno funzione di cellule presentanti l'antigene capaci di indurre ed espandere le cellule T regolatrici Foxp3⁺ *in vitro* [68-69]. Tale osservazione suggerisce un ulteriore potenziale meccanismo d'azione con cui le cellule B regolatrici potrebbero essere in grado di mediare l'immunomodulazione, come accade per la loro controparte nel modello murino.

Newel e collaboratori osservarono inoltre una maggior percentuale di cellule B secernenti IL-10 in un gruppo di pazienti trapiantati di rene in stato di tolleranza completa e in individui sani, rispetto a pazienti stabilmente immunosoppressi [70]. In accordo dunque con l'emergente riscontro di una popolazione specializzata di cellule B regolatrici (B_{REG}) con funzioni immunomodulanti, tale osservazione solleva l'ipotesi di un possibile intervento dei B_{REG} nel mantenimento della tolleranza nei confronti degli organi trapiantati.

Rimane poco chiaro quale via di stimolazione sia maggiormente in grado di accrescere le capacità regolatrici delle cellule B_{REG}. Diversi *pattern* di segnalazione sono stati presi in considerazione, inclusi quelli generati dalla stimolazione del BCR (B cell receptor), dei *Toll-like receptor* e quelli dipendenti dalla via del CD40. Molteplici studi hanno evidenziato come ognuno di questi *pattern* possa incrementare l'attività immunomodulante delle cellule B, tuttavia è ancora in discussione quale di questi sia maggiormente efficiente.

Recentemente è stata confermata l'esistenza di un' interazione tra B_{REG} e T_{REG} tramite la rilevazione della capacità delle cellule B_{REG} di prevenire e permettere la

remissione dell'inflammation allergica delle vie aeree, in modelli murini, grazie all'induzione delle cellule T_{REG} [71].

È dunque dimostrata l'attività immunomodulante delle cellule B_{REG} grazie alla soppressione della proliferazione delle cellule T CD4⁺, all'inibizione della produzione di INF- γ da parte delle stesse cellule T CD4⁺, tramite la stimolazione dell'espressione di Foxp3 e CTLA-4 nelle cellule T_{REG}.

Cellule B_{REG} sono state riscontrate nella popolazione di cellule B localizzate a livello della zona marginale splenica (MZ), nella popolazione di precursori T2-MZ e tra le cellule risiedenti nella zona follicolare. Vari fenotipi di B_{REG} sono stati dunque descritti.

Le cellule B regolatrici possono presentare un fenotipo sovrapponibile a quello di cellule B immature CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}CD27⁻ oppure a quello di cellule B memoria CD24^{high}CD27⁺, la maggior parte delle quali esprimenti CD38.

Di recente Yanaba e collaboratori, hanno identificato una piccola popolazione di B_{REG}, corrispondenti a circa il 2% delle cellule B spleniche, con fenotipo CD1d^{high}Cd5⁺ parzialmente sovrapposto con quello delle cellule MZ e T2-MZ. Tale sottopopolazione di cellule B è composta da un maggior numero di cellule secernenti IL-10 se paragonata ad altre e potrebbe essere quella maggiormente implicata nell'attività regolatrice a livello splenico [72].

Le cellule B_{REG} vengono inoltre identificate per l'espressione di una molecola di co-stimolazione che prende il nome di TIM-1 (*T cell Ig domain and mucin domain protein 1*).

TIM-1 (T cell Ig domain and mucin domain protein 1)

TIM-1 è una molecola di co-stimolazione, appartenente alla famiglia delle molecole TIM, in grado di regolare la risposta immune modulando la differenziazione delle cellule T CD4⁺ effettrici [73].

Precedentemente considerata come molecola esclusiva delle cellule T, TIM-1 è stata successivamente dimostrata non solo essere identificativa delle cellule B_{REG}, ma anche indispensabile nell'induzione della tolleranza.

È stato provato inoltre in modelli murini, che TIM-1 risulta maggiormente espresso su cellule B rispetto alle cellule T, tuttavia non è ancora chiaro quale sia il ruolo di tale molecola al di fuori dell'azione esercitata sulle cellule T CD4⁺.

TIM-1 risulta essere espresso dalla maggior parte delle cellule B regolatrici secernenti IL-10, incluse le cellule della zona marginale, le cellule di transizione e le cellule follicolari. Le cellule B TIM-1⁺ esprimono elevati livelli di IL-4 e IL-10, promuovono la risposta Th2 dipendente e sono direttamente coinvolte nell'induzione della tolleranza verso gli organi trapiantati.

L'utilizzo di anticorpi specifici per TIM-1 ha permesso di suggerire l'ipotesi di un coinvolgimento di TIM-1 nella generazione dei B_{REG}. Il legame anticorpo/TIM-1 determinerebbe un incremento della percentuale di cellule B_{REG} dal 7% al 25% della popolazione di cellule B spleniche e indurrebbe la secrezione citochinica da parte delle B_{REG} stesse.

L'induzione dei B_{REG} tramite una via di segnalazione IL-4 dipendente, in seguito al legame del TIM-1, suggerisce che TIM-1 possa essere sfruttato come nuovo *target* terapeutico nella modulazione della risposta immunitaria. La produzione di IL-4 da parte delle stesse cellule B appare cruciale; le cellule B secernenti IL-4, indotte da anticorpi anti-TIM-1, possono promuovere la secrezione citochinica da parte di Th2 e questo è a sua volta in grado di determinare l'induzione di cellule B TIM-1⁺.

La produzione di IL-4 da parte di linfociti B TIM-1⁺ può inoltre determinare l'aumento dell'espressione di TIM-1 da parte di B TIM-1⁻. Sebbene non necessaria, anche la secrezione di IL-4 dovuta a cellule T CD4⁺ può incrementare l'espressione di TIM-1.

La secrezione di IL-10 avviene in modo direttamente proporzionale all'espressione del TIM-1.

TIM-1 risulta essere dunque, un *marker* caratteristico per l'individuazione delle cellule B_{REG} secernenti IL-10.

Tolleranza e trapianto d'organo

Il termine tolleranza, in campo trapiantologico, è inteso come il mancato danneggiamento dell'organo da parte del sistema immunitario del ricevente, anche in assenza di terapia immunosoppressiva.

L'obiettivo principale della medicina dei trapianti moderna consiste nel raggiungimento della tolleranza immunologica completa nei confronti del trapianto.

Nonostante lo sviluppo di protocolli immunosoppressivi efficaci e il notevole miglioramento della sopravvivenza a breve termine dell'organo trapiantato, la perdita del *graft* a causa del danno da rigetto acuto e cronico rimane un problema di primaria importanza. Come conseguenza, l'induzione e il mantenimento della tolleranza immunologica rappresenta un obiettivo fondamentale della ricerca e della pratica clinica in ambito trapiantologico.

Tale esigenza è ancor più evidente quando si consideri che nessuna delle strategie immunosoppressive a nostra disposizione permette di raggiungere una completa tolleranza ("tolleranza vera" o "*operational tolerance*"), condizione che permetterebbe la sospensione dell'assunzione degli immunosoppressori.

Il raggiungimento di quella che viene definita una "quasi tolleranza" (*prope tolerance*) permette di adottare dei protocolli di "minimizzazione dell'immunosoppressione" che consentono nel contempo di ridurre il carico immunosoppressivo, al fine di diminuire gli effetti sfavorevoli dei farmaci e di mantenere sotto controllo la risposta immunitaria, senza aumentare il rischio di rigetto d'organo.

La risposta alloimmune

Il trapianto d'organo comporta l'interazione tra le cellule T del ricevente ed antigeni del donatore determinando l'insorgenza di una risposta immunitaria e un rischio consistente di rigetto dell'organo stesso.

Il riconoscimento di peptidi esogeni, responsabile della maggior parte delle reazioni di rigetto, può avvenire direttamente per l'interazione di linfociti T del ricevente e molecole allogeniche di MHC intatte complessate con allo-antigeni, derivanti dalle cellule dell'organo trapiantato, oppure indirettamente per l'incontro tra T del ricevente e allo-antigeni legati a molecole self di MHC.

Il riconoscimento diretto è possibile grazie alla migrazione di APC del donatore dal *graft* alle stazioni linfonodali del ricevente [74] con conseguente presentazione da parte delle stesse, di complessi antigene-molecola MHC allogenica a linfociti T dell'ospite. Ne consegue l'insorgenza di una risposta infiammatoria T mediata diretta verso l'organo trapiantato, che esita in rigetto acuto o iperacuto. L'esistenza di questa popolazione di cellule T alloreattive in grado di riconoscere molecole MHC allogeniche è da tempo un interrogativo, rimasto insoluto, in

campo immunologico, in quanto contrastante con le regole di base della restrizione degli MHC.

Il riconoscimento diretto può dunque essere interpretato come un fenomeno dipendente dalla cross-reattività dei linfociti T verso MHC allogenici. Tale evento dipende dalla capacità di TCR esposti su cellule T del ricevente ristrette per MHC *self* di riconoscere residui polimorfici di MHC del donatore che mostrano strutture simili a quelle di molecole MHC *self* [75].

Il pool di cellule T alloreattive del ricevente comprende sia cellule T naive CD45RA⁺ che cellule T memory CD45RO⁺ [76].

Un meccanismo di stimolazione della via diretta, meno descritto, consiste nella presentazione degli stessi allo-MHC da parte di cellule endoteliali ed epiteliali attivate, appartenenti all'organo trapiantato.

Nonostante diversi studi abbiano provato che tale modalità di presentazione sia in grado di stimolare la risposta T linfocitaria tramite un segnale di co-stimolazione di livello inferiore [77], altri lavori sostengono che tale meccanismo potrebbe non risultare necessariamente nella stimolazione della risposta allo-reattiva [78].

La via indiretta di presentazione è il risultato del processamento e della presentazione di antigeni del donatore da parte di molecole *self* di MHC esposte su APC del ricevente. L'interazione tra APC del ricevente e antigeni del donatore può avvenire a livello del torrente ematico per diffusione dei peptidi di derivazione dalle cellule del *graft* nella circolazione, a livello dell'organo trapiantato o nei linfonodi del ricevente per la fagocitosi di APC del donatore migrate a questo livello.

La stimolazione delle cellule T da parte di questa via di riconoscimento ha inizio immediatamente dopo il trapianto dell'organo e perdura per tutta la vita dell'organo trapiantato.

La percentuale di cellule T con specificità per la via indiretta risulta essere notevolmente inferiore rispetto a quella di linfociti T specifici per la via diretta [79].

In considerazione di ciò, nonostante la stimolazione mediante la via indiretta abbia inizio subito dopo il trapianto, l'iniziale scarsa intensità della risposta allogenica indiretta non è considerata sufficiente a determinare l'insorgenza del

rigetto acuto o iperacuto. La continua e crescente risposta immune verso antigeni presentati per via indiretta, determina invece, una graduale amplificazione della risposta T effettrice, che culmina infine nel rigetto cronico immuno-mediato [80]. Il *pattern* semi-diretto di riconoscimento è l'entità di presentazione di più recente definizione. Tale modalità interviene quando complessi allogenici MHC-peptide vengono catturati dalle membrane delle cellule del *graft* da parte di APC del ricevente.

I complessi internalizzati dalle APC mantengono una certa integrità molecolare e di struttura tale da permettere una risposta immunitaria T di tipo diretto [81].

È necessario inoltre considerare che esiste la possibilità per qualsiasi APC di presentare contemporaneamente gli antigeni per via diretta ed indiretta.

È stato dimostrato inoltre, che anche una quota di linfociti B, così come di cellule dendritiche e macrofagi, è in grado di catturare molecole allogeniche di MHC.

Sembrerebbe poi, che anche cellule derivanti dall'organo trapiantato possano presentare complessi MHC-peptide del ricevente [82].

Il concetto di via semi-diretta dimostra come né una né l'altra via di riconoscimento siano mutualmente esclusive, ma possano invece coesistere.

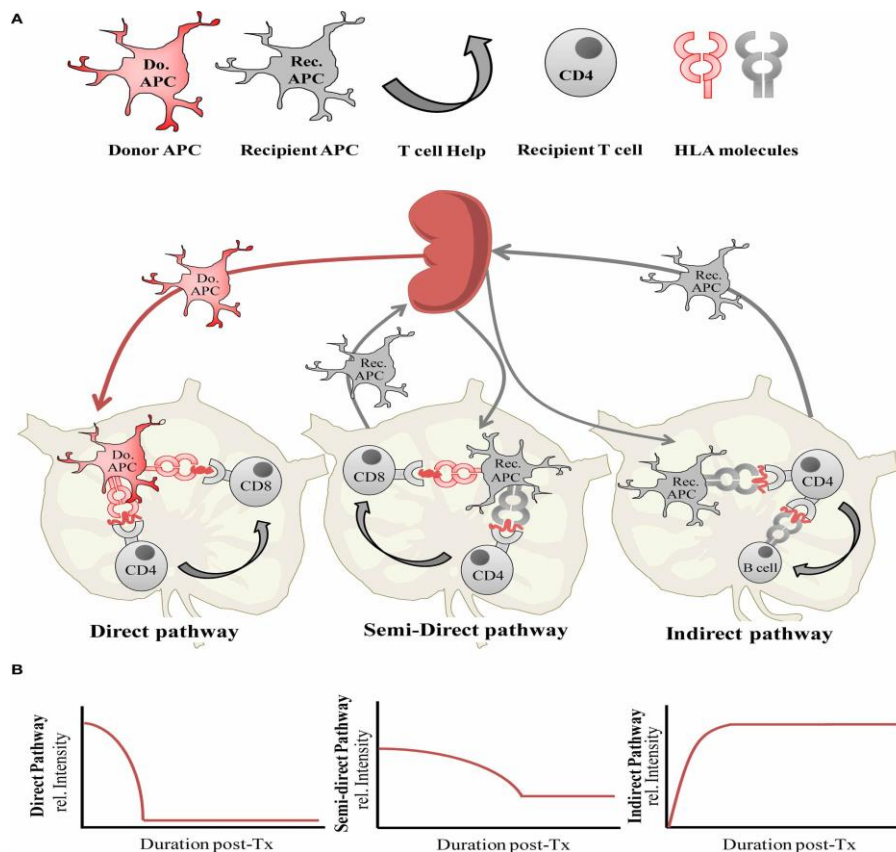


Fig. 1

(A) presentazione degli alloantigeni tramite la via diretta/indiretta/semidiretta dopo trapianto d'organo.

(B) intensità relativa di ognuna delle modalità di presentazione nel post-trapianto.

(RELEVANCE OF REGULATORY T CELL PROMOTION OF DONOR-SPECIFIC TOLERANCE IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION – Sagoo, *Front. Immunol.*, 13 July 2012).

Se sia le APC del donatore che quelle del ricevente siano ugualmente efficienti nell'indurre la generazione dei T_{REG} o l'espansione dei $n T_{REG}$ è un quesito la cui risposta rimane ancora da definire.

In alcuni modelli di trapianto i T_{REG} che inducono tolleranza dimostrano un *pattern* di riconoscimento antigenico di tipo indiretto, implicando dunque, una maggior importanza in tale processo delle APC del ricevente.

Le APC potrebbero inoltre rappresentare i *target* della soppressione mediata dai T_{REG} in vivo, tuttavia non è ancora noto se i linfociti T_{REG} siano ugualmente efficaci nella repressione di APC sia del donatore che del ricevente o se i T_{REG} e $n T_{REG}$ riconoscano o meno gli stessi alloantigeni.

La tolleranza verso l'organo trapiantato

Le cellule T_{REG} svolgono un ruolo fondamentale e di primaria importanza nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza verso il trapianto.

Studi effettuati su modelli murini negli ultimi cinquant'anni hanno permesso di analizzare sempre più accuratamente i meccanismi che permettono l'instaurarsi della tolleranza nei confronti degli organi trapiantati.

I primi esperimenti, ad opera di Billingham, Brent e Medawar, hanno dimostrato che il trapianto di cute tra topi con MHC differenti viene accettato quando il ricevente è esposto in epoca neonatale agli alloantigeni del donatore [83].

I meccanismi di tolleranza coinvolti nel trapianto d'organo comprendono sia quelli di tipo centrale che quelli periferici.

Due meccanismi di tolleranza centrale sono stati valutati al fine di ottenere l'induzione della tolleranza in ambito trapiantologico: la somministrazione intratimica di antigeni e il microchimerismo.

Il primo approccio, inizialmente studiato da Posselt [84] è stato successivamente analizzato da altri autori che hanno confermato che l'iniezione intratimica di antigeni del donatore, associata alla deplezione leucocitaria periferica, rende possibile la tolleranza immunitaria nei modelli murini [85]. Tuttavia rimangono aperte numerose problematiche: gli antigeni persistono nel timo solo per un lasso di tempo limitato e strategie aggiuntive sono necessarie al fine di controllare la reattività dei linfociti T.

Il microchimerismo esprime una condizione in cui elementi emopoietici del donatore e del ricevente coesistono. Tale stato viene ottenuto sottoponendo il ricevente, prima del trapianto, ad una dose sub-letale di radiazioni o somministrando agenti mieloablativi con conseguente distruzione del patrimonio di cellule T. Successivamente si sottopone il ricevente a trapianto di midollo osseo proveniente dallo stesso donatore dell'organo [86]. Le conseguenze cliniche delle radiazioni e dei regimi mieloablativi non hanno tuttavia consentito l'espansione di questo approccio.

In considerazione dell'elevata frequenza di linfociti T effettori, sembrerebbe intuitivo supporre che i meccanismi di delezione svolgano un ruolo chiave nella

fase di induzione della tolleranza del trapianto verso i complessi alloantigeno-MHC.

In aggiunta alla delezione intratimica, meccanismi di tolleranza periferica, quali anergia, ignoranza, soppressione e regolazione [87] contribuiscono al raggiungimento della tolleranza dell'organo trapiantato.

Un'elevata affinità di legame o una ripetuta stimolazione del TCR può portare alla deplezione delle cellule T tramite apoptosi sia a livello timico che periferico, fenomeno da riferire rispettivamente a delezione centrale e periferica. Studi recenti hanno dimostrato che l'inibizione del meccanismo di delezione porta al rigetto del *graft*, al contrario strategie che promuovono la deplezione dei linfociti T esitano nella *graft versus host disease* (GVHD) [88].

Nel caso in cui la cellula T sia stimolata esclusivamente dalla presentazione dell'antigene in assenza del segnale di co-stimolazione, si verifica il meccanismo di anergia che comporta l'inattivazione funzionale della cellula.

Innumerevoli molecole tra le quali CD28, ICOS (*inducible T cell co-stimulator*) e CD40L possono fornire il segnale di co-stimolazione. CTLA-4, molecola di superficie espressa dalle cellule T attivate, considerata un regolatore naturale della risposta immunitaria, interagisce con gli stessi ligandi del CD28. Tale interazione provoca l'inibizione per competizione della via del CD28, in virtù della maggiore affinità del CTLA-4 per i ligandi del CD28. L'utilizzo di Ig anti CTLA-4, in modelli murini, al momento del trapianto, ha permesso di osservare una sopravvivenza dell'organo a lungo termine. L'applicazione in campo farmacologico di tale osservazione è stata l'introduzione del Betalcept, un derivato di CTLA-4Ig, con affinità ancora maggiore per i due ligandi di CD28 e CTLA-4. Si è inoltre tentato in alcuni esperimenti di indurre tolleranza bloccando la via di co-stimolazione di CD40-CD40L per mezzo di anticorpi monoclonali anti-CD40 ligando. Tale strategia ha permesso di prolungare la durata di trapianti di cute in modelli murini.

Molteplici studi hanno descritto come la tendenza dei T_{REG} a convergere a livello del sito di origine degli antigeni, favorisca lo stabilirsi di uno stato di tolleranza immunitaria [89]. In modelli di tolleranza completa verso l'organo trapiantato,

T_{REG} capaci di determinare la condizione di tolleranza nel ricevente sono stati riscontrati sia nei linfonodi che a livello dei tessuti dell'organo trapiantato.

Ciò che ancora molti studi non sono stati in grado di dimostrare è se i T_{REG} siano generati altrove e migrino successivamente a livello dell'organo trapiantato oppure se la conversione a T_{REG} avvenga all'interno dello stesso.

Sagoo e collaboratori hanno recentemente provato che il trasferimento di T_{REG} umane implicate nella via di risposta immunitaria allogenica diretta è più efficiente nel prevenire il rigetto di trapianti di cute in modelli murini umanizzati di xenotrapianto, se paragonato al trasferimento di T_{REG} policlonali [90]. Nonostante una percentuale paragonabile di T_{REG} policlonali ed allospecifici fosse riconosciuta a livello del tessuto cutaneo trapiantato, un maggior numero di T_{REG} allospecifiche era in grado di interagire con gli alloantigeni presentati dalle cellule del donatore.

La soppressione mediata dai T_{REG} avviene principalmente a livello dei siti di espressione degli alloantigeni e probabilmente dipende dalla precoce interazione con le APC, dalla modulazione della loro funzione e dal reclutamento di cellule effettrici [91].

Studi condotti a distanza di 4 settimane dimostrarono un aumento significativo del numero di T_{REG} a livello dei tessuti trapiantati. Questa osservazione ha permesso di avvalorare l'ipotesi secondo cui l'espansione o la sopravvivenza dei T_{REG} fosse dipendente dalla stimolazione antigenica [92].

Un ulteriore meccanismo coinvolto nell'induzione della tolleranza risulta essere la diminuita risposta alla via diretta di presentazione, condizione che si instaura rapidamente dopo il trapianto di organi solidi ed è generalmente associata con una funzionalità stabile post-trapianto.

Una scarsa risposta immunitaria donatore-specifica è stata riscontrata nel trapianto di rene, di cuore e di polmone.

È stata inoltre descritta una diminuita risposta anche alla via indiretta di presentazione degli alloantigeni presentati dai tessuti del donatore.

Il raggiungimento della tolleranza in campo trapiantologico, può essere considerato come un processo costituito da due fasi, una di induzione e una di mantenimento.

Sebbene le funzioni regolatorie siano considerate meccanismo integrante della fase di induzione, sembrerebbe che la presenza dei T_{REG} non sia una caratteristica fondamentale della tolleranza a lungo termine, nonostante questa rappresenti un fenomeno organo-specifico.

CAP. 2: IL RIGETTO NEL TRAPIANTO D'ORGANO

Il trapianto di tessuti, organi o cellule da un donatore geneticamente differente dal ricevente induce nel ricevente stesso una risposta immunitaria diretta contro gli alloantigeni del graft. Se non controllata, tale risposta può distruggere il graft [215].

In base al momento in cui insorge il rigetto può essere classificato in iperacuto, acuto o cronico [216].

Il rigetto iperacuto si sviluppa nel giro di minuti o poche ore dopo il trapianto, è causato dalla presenza di anticorpi pre-formati contro il donatore ed è solitamente complemento mediato.

Il rigetto acuto accelerato insorge entro poche ore o giorni dal trapianto mediato dalla presensibilizzazione dovuta alla presenza di anticorpi anti-HLA.

Il rigetto acuto si sviluppa rapidamente nell'arco di pochi giorni e può insorgere nei giorni successivi al trapianto ma anche a distanza di anni; è correlato alla formazione di linfociti T antigene-specifici e/o ad anticorpi diretti contro il graft. Il rigetto cronico insorge nel giro di mesi o anche anni dal trapianto ed è anch'esso mediato da meccanismi immunitari diretti contro il graft da parte di linfociti T e/o anticorpi.

Recentemente è stata identificata un'altra categoria di rigetto, il rigetto subclinico, nella quale rientrano quadri caratterizzati da danno istologico mediato da anticorpi o da cellule T, a cui non corrisponde un significativo peggioramento funzionale.

Il rigetto è inoltre classificato, in base ai meccanismi immunologici sottostanti in rigetto anticorpo e T-cellulo mediato.

Il rigetto T-cellulo mediato

Il rigetto T-cellulo mediato (TCMR) è un fenomeno di rilevanza clinica notevole nel trapianto d'organo nonché un modello patogenetico delle malattie infiammatorie T-cellulo mediate [269].

L'elemento chiave del TCMR è l'infiltrazione dell'interstizio dell'organo trapiantato da parte di linfociti T del ricevente e di macrofagi (monociti e cellule dendritiche in vari stadi di maturazione ed attivazione) che inducono danno e progressivo deterioramento dell'organo.

Nel graft l'elemento caratteristico è proprio il riscontro di infiltrati di linfociti T effettori del ricevente e di cellule presentanti l'antigene del donatore che creano una zona di infiammazione locale (Fig. 2). Tra i linfociti T effettori si riconoscono sia cellule T *naive* provenienti dagli organi linfoidi secondari sia cellule T memoria, che sono in grado di attivarsi in seguito a stimoli eterologhi [270]. Le sedi di riattivazione ed espansione clonale dei linfociti T memoria non sono del tutto chiare, ma non sembra siano gli organi linfoidi secondari [271]. I meccanismi patogenetici sottostanti il TCMR portano sostanzialmente ad una gamma stereotipata di lesioni e di modifiche cellulari indipendentemente dal meccanismo di presentazione antigenica e dal tipo di antigene. Le molecole presentanti l'antigene del complesso MHC inducono l'attivazione delle cellule T *naive* tramite presentazione e riconoscimento diretto, indiretto o semi-diretto [271], tuttavia il meccanismo sottostante non sembra influire sul tipo di lesione provocata.

A TCMR: Creating the Interstitial Infiltrate

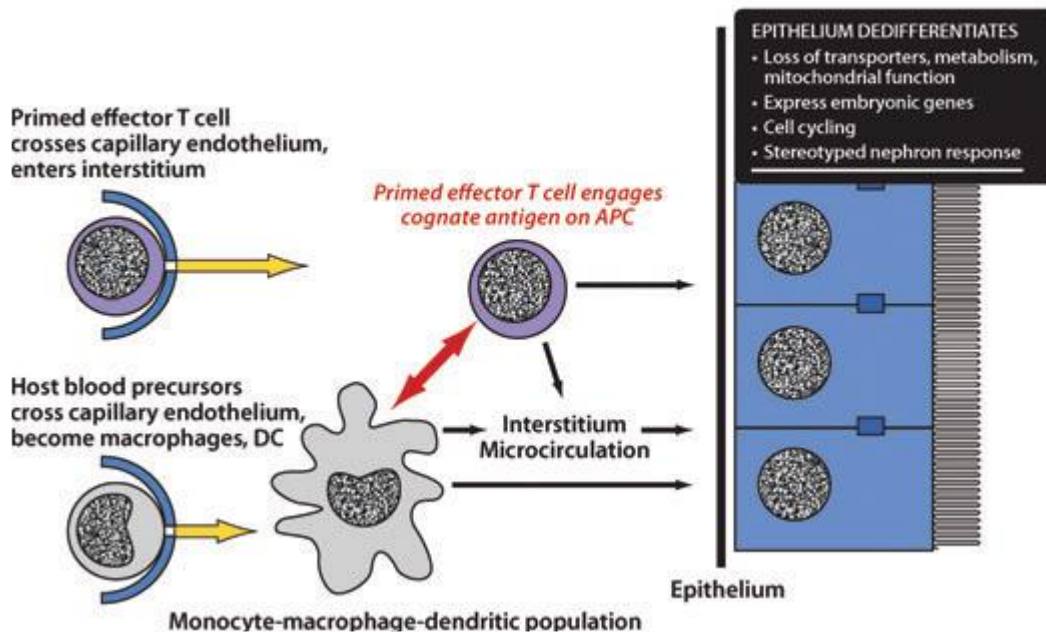


Fig. 2:

Il TCMR è mediato da un processo locale analogo all'ipersensibilità-T mediate, indipendente dal contatto tra le cellule T effettrici e le cellule L'interazione tra le cellule T effettrici antigene-specifiche e le cellule presentanti l'antigene stimola la liberazione di fattori solubili sia dalle cellule T effettrici sia dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, che inducono modificazioni a carico dell'epitelio, provocandone (*T CELL-MEDIATED REJECTION OF KIDNEY TRANSPLANTS: A PERSONAL VIEWPOINT- Halloran, Am. J. of Transpl, 2010; 10:1126-1134*)

In modelli murini di trapianto renale le cellule T sono state osservate prima ancora che nell'interstizio, nelle zone peri-arteriolarie [274]. Si tratta per lo più di cellule T memoria, anche se nel rene di alcuni topi trapiantati sono state ritrovate cellule T che avevano perso i markers tipici delle cellule memoria [274]. Il precoce ingresso di queste cellule T nel graft e la loro attivazione è un meccanismo che può precedere l'insorgenza del TCMR. Recentemente è stata dimostrata la presenza di cellule T memoria circolanti che giocano un ruolo di sorveglianza a livello periferico. Queste cellule fungono da prima linea di difesa, "pattugliando" i vari organi e tessuti [273]. Le cellule T memoria periferiche hanno la capacità di penetrare negli organi trapiantati anche in assenza di un danno d'organo. Due sono i meccanismi attraverso cui le cellule T possono penetrare nell'organo trapiantato: 1) mediante riconoscimento di antigeni espressi sull'endotelio; 2) entrando nel graft grazie al loro ruolo di sentinelle dei tessuti periferici e dei tessuti danneggiati venendo a contatto con le cellule presentanti l'antigene del

donatore a livello interstiziale [273, 276]. In entrambi i casi l'interazione tra le cellule T e gli antigeni del donatore scatena una reazione infiammatoria, con richiamo di altri linfociti T e macrofagi. Una volta che la risposta infiammatoria si è innescata, i linfociti T che penetrano nel graft legano l'endotelio attraverso meccanismi indipendenti dal riconoscimento degli antigeni specifici del donatore, ma si attivano in virtù delle modifiche dell'endotelio indotte dall'infiammazione stessa. Come in tutti i tessuti infiammati, aumenta la permeabilità capillare e si crea l'edema pericapillare. Nel TCMR i linfociti T effettori attraversano i capillari del donatore senza distruggere, almeno inizialmente, le cellule endoteliali, a testimoniare la presenza di meccanismi di protezione nei confronti di tali cellule [277]. D'altronde nei processi di difesa contro antigeni estranei (quali virus o batteri) le cellule T devono attivarsi contro l'ospite senza danneggiare il microcircolo. L'endotelio esprime alcune molecole MHC con capacità di presentare l'antigene [278], ma è piuttosto resistente alla distruzione mediata dai linfociti T, anzi l'espressione delle molecole MHC è tale da garantire addirittura protezione dai danni potenziali di tali cellule [277]. Il TCMR di solito non determina eventi ischemici nel parenchima del graft, potendosi manifestare per diversi giorni o settimane come uno sfumato danno tubulo-interstiziale, che comunemente risponde bene al trattamento steroideo.

Il reclutamento dei leucociti nel TCMR è selettivo, coinvolgendo sia strategie di selezione in positivo (l'attrazione) sia in negativo (l'esclusione). Le chemochine possono agire sia come agonisti che come antagonisti, attraendo alcuni leucociti ed escludendone altri (ad esempio neutrofili ed eosinofili). La scarsità di eosinofili presenti nel TCMR testimonia che esistono dei meccanismi inibitori mediati dal IFNG, che inibisce l'eotassina e ne antagonizza i recettori attraverso CXCL9, CXCL10 e CXCL11 [279, 280].

Quando il TCMR si innesca, prima ancora che si sviluppi la tubulite, l'epitelio va incontro a processi di de-differenziazione, con la perdita di proteine e fattori di trascrizione connessi con le sue funzioni [280] (Fig. 3). Le cellule mononucleate si accumulano nell'interstizio prima ancora che le cellule T passino attraverso la membrana basale raggiungendo l'epitelio e determinando la tubulite, che rappresenta un elemento diagnostico del TCMR. Nei trapianti la tubulite correla

fortemente con l'infiammazione interstiziale e riflette la de-differenziazione epiteliale in risposta all'infiammazione interstiziale. La tubulite insorge anche in altre situazioni caratterizzate dal danno e dalla de-differenziazione epiteliali come la necrosi tubulare acuta e le nefriti interstiziali. La tubulite non è quindi un processo dipendente esclusivamente dalle cellule T.

B Tubulitis Reflects Epithelial Dedifferentiation

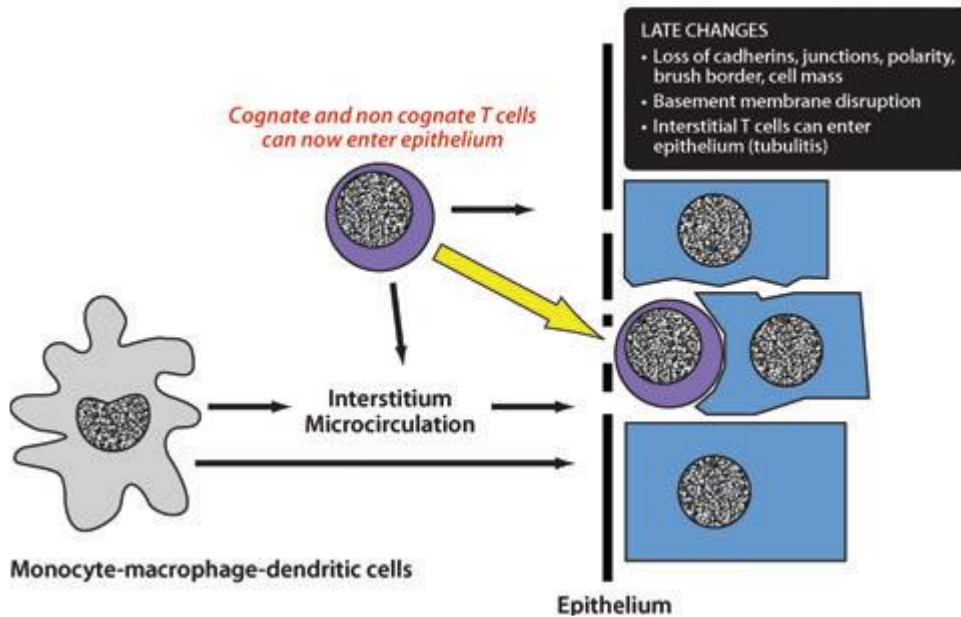


Fig. 3:

La dedifferenziazione dell'epitelio con perdita delle caderine, delle giunzioni intercellulari, della polarità e dell'integrità epiteliale può favorire l'insorgenza della tubulite. (*T CELL-MEDIATED REJECTION OF KIDNEY TRANSPLANTS: A PERSONAL VIEWPOINT- Halloran, Am. J. of Transpl, 2010; 10:1126-1134*)

CAP. 3: TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA ed m-TOR INIBITORI

Obiettivo centrale nel trapianto d'organo rimane la riduzione dell'incidenza del rigetto del *graft* sia esso acuto o cronico. Lo sviluppo in ambito trapiantologico di terapie immunosoppressive efficaci è dunque la chiave per il mantenimento nel tempo di una buona funzione d'organo.

Gli immunosoppressori sono utilizzati come terapia di induzione, di mantenimento e nel trattamento del rigetto.

Dal 1960 a oggi, sono state utilizzate diverse classi di immunosoppressori: corticosteroidi, inibitori della calcineurina, antimetaboliti, inibitori dell'm-TOR, anticorpi policlonali, anticorpi monoclonali (anti-CD3, anti-CD52, anti-CD20, anti-CD25), immunoglobuline endovenose.

Ad oggi, a differenza dei trapianti di fegato, polmone, cuore e pancreas, l'indicazione terapeutica per il trapianto di rene prevede l'utilizzo di tutte le classi di immunosoppressori.

Per molti anni l'immunosoppressione nel trapianto di rene si è basata sull'uso di tre farmaci: azatioprina, steroidi e ciclosporina. Negli ultimi vent'anni hanno acquistato un ruolo rilevante ulteriori agenti immunosoppressori, tra cui il micofenolato mofetile, il sirolimus, l'everolimus e gli anticorpi monoclonali contro il recettore dell'interleuchina 2.

La classe degli antimetaboliti comprende l'Azatioprina, farmaco che ha avuto un ruolo minoritario negli ultimi anni, il Micofenolato Mofetile e il Micofenolato Sodico.

L'Azatioprina, sostanza derivata dalla 6-mercaptopurina, fu il primo immunosoppressore a raggiungere un utilizzo ampiamente diffuso nel trapianto d'organo [93]. Agisce come falso nucleotide, in quanto viene incorporata negli acidi nucleici e interrompe la sintesi del DNA e dell'RNA. Blocca la replicazione cellulare dopo la stimolazione antigene dipendente. Dopo l'introduzione della Ciclosporina è diventata un farmaco di seconda linea.

Il Micofenolato Mofetile, la cui forma attiva è l'acido micofenolico, inibisce l'inosina monofosfato deidrogenasi, enzima chiave nella sintesi delle purine. In

trial effettuati su larga scala in associazione alla Ciclosporina, è risultato essere superiore all'azatioprina nel prevenire il rigetto d'organo [94]

Gli steroidi (prednisone e metilprednisolone) agiscono come agonisti dei recettori per i glucocorticoidi, ma ad elevate dosi hanno un effetto recettore-indipendente. Gli effetti mediati dai recettori sono in gran parte trascrizionali, tramite il legame al DNA ed interazioni proteina-proteina tra il complesso recettoriale e fattori di trascrizione, come NF-kB [95]. Bloccano diverse attività cellulari, tra cui la produzione e la proliferazione di citochine (IL6, IL2, TNF, IFN γ), agendo più sull'immunità cellulo-mediata che su quella umorale.

Gli Inibitori della Calcineurina (CNI) occupano ancora un posto di notevole rilievo nell'immunosoppressione data la loro selettività d'inibizione delle cellule T e B. La possibilità d'impiego in associazione a farmaci quali il Sirolimus e gli anticorpi monoclonali contro il recettore dell'interleuchina-2 ha consentito di sviluppare nuove strategie terapeutiche.

La Ciclosporina, farmaco a struttura ciclica, legandosi alla calmodulina, inibisce la funzione della calcineurina [96], bloccando in tal modo la produzione di citochine e in particolare dell'IL-2.

Il Tacrolimus (FK506), macrolide a struttura ciclica, con una potenza maggiore rispetto alla Ciclosporina [97], possiede un meccanismo d'azione analogo a questa, inibendo la calcineurina e legandosi a una proteina intracitoplasmatica (FKB-12) che forma un complesso con essa e con la calmodulina.

Gli Anticorpi monoclonali *anti IL-2 receptor* sono anticorpi monoclonali chimerici rivolti contro il recettore linfocitario dell'IL-2, prodotti con la tecnologia del DNA ricombinante.

Il Basiliximab (Simulect) possiede le regioni costanti delle catene leggere e pesanti di origine umana, mentre le regioni variabili sono interamente murine.

Il Daclizumab (Zenapax) possiede una percentuale ancora minore di origine murina (10% dell'intera molecola). Entrambi sono in grado di saturare la subunità α del recettore per l'IL-2 per una durata di circa 120 giorni, determinando una drastica riduzione del numero di linfociti CD25 circolanti, che perdura per 4 mesi. Vengono sfruttati per l'induzione dell'immunosoppressione, essendo

somministrati e.v. in un solo ciclo terapeutico, subito dopo il trapianto. Riducono l'incidenza di rigetto acuto, risultando quasi privi di effetti collaterali [98]

L'obiettivo ultimo della terapia immunosoppressiva rimane quello di ottimizzare gli schemi terapeutici minimizzando gli effetti collaterali, ed incrementando la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti trapiantati: questo è risultato essere più facilmente realizzabile grazie all'utilizzo combinato dei farmaci a disposizione.

m-TOR INIBITORI

Gli inibitori del *mammalian target of rapamycin* (m-TORi) costituiscono una delle classi di farmaci immunosoppressori più recentemente studiate. Contrariamente agli altri macrolidi non agiscono sul I segnale di attivazione dei linfociti T, bensì sul III.

A questa categoria di farmaci appartengono il Sirolimus o Rapamicina e l'Everolimus.

Il complesso m-TOR gioca un ruolo chiave nella risposta immunitaria. Gli m-TOR inibitori sopprimono l'attivazione e la proliferazione delle cellule T, impedendo la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, configurandosi quindi come immunosoppressori a tutti gli effetti.

Recentemente un crescente interesse è stato rivolto, all'interno della comunità scientifica, nei confronti del loro potenziale ruolo di induzione di tolleranza immunitaria, nel post-trapianto.

Tale osservazione è basata sulla scoperta che gli m-TORi inducono anergia nelle cellule T *naive*, promuovono l'espansione dei linfociti T regolatori e inibiscono la maturazione delle cellule dendritiche.

Le attuali indicazioni per l'impiego degli mTORi nel trapianto di rene comprendono la minimalizzazione delle dosi di CNI, lo sviluppo di neoplasie nel post-trapianto o l'utilizzo in pazienti con anamnesi neoplastica pregressa e la nefropatia policistica, come patologia di base.

L'associazione di CNI ed mTORi, con eventuale successiva sospensione del CNI, viene utilizzata in particolare nel trattamento di pazienti in terapia di base con CNI e con una diagnosi certa di disfunzione cronica da trapianto, dovuta prevalentemente alla nefrotossicità di tali farmaci in assenza di fattori

immunologici. Tale schema immunosoppressivo viene impostato nel tentativo di rallentare il peggioramento funzionale.

Lo sviluppo di neoplasie post-trapianto rappresenta un'ulteriore indicazione all'inserimento degli mTORi, in associazione o meno a CNI, in ragione dell'attività anti-proliferativa e dunque anti-neoplastica dimostrata da tale classe di farmaci.

La dimostrazione della capacità della rapamicina di inibire la proliferazione dell'epitelio cistico di reni policistici, ha portato a considerare i farmaci della classe degli mTORi come una valida alternativa nel trattamento immunosoppressivo di pazienti trapiantati, con nefropatia policistica. La somministrazione di rapamicina, in modelli sperimentali, è risultata infatti, in grado di ridurre la formazione e la crescita delle cisti.

In pazienti portatori di trapianto renale in trattamento con rapamicina, è stata dimostrata una riduzione del volume delle cisti epatiche, nonché dell'organo in toto.

Rapamicina

Il Sirolimus, anche noto come Rapamicina o AY-022989, è un macrolide lipofilico di 912 kDa, isolato da un batterio, lo *Streptomyces hygroscopicus* [99], sull'isola di Rapa Nui nel 1969.

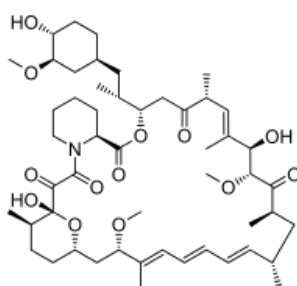


Fig. 4 Formula di struttura della rapamicina

Sebbene siano state inizialmente identificate solo le sue capacità di potente anti-fungino e anti-neoplastico, la sua attività anti-proliferativa è stata successivamente resa nota in concomitanza con studi effettuati su modelli animali di malattie autoimmuni e di artrite.

La sua potente azione immunosoppressiva è stata riportata per la prima volta nel 1988, quando l'individuazione di un residuo di acido amidico analogo ad uno contenuto negli anelli macrobactamici del tacrolimus ha suggerito il coinvolgimento del Sirolimus nella modulazione dell'immunità.

Il Sirolimus è stato introdotto negli schemi immunosoppressivi nel 1999 [100] in associazione ad altre classi di immunosoppressori, dimostrando di essere in grado di ridurre in modo significativo l'incidenza degli episodi di rigetto acuto nel trapianto renale.

Il meccanismo d'azione consiste nell'inibizione della proliferazione dei linfociti T attraverso il blocco nella fase G1 ed S. Tale effetto viene ottenuto grazie al legame intracellulare ad una proteina denominata FKBP-12 (FK binding protein) [101], appartenente alla famiglia delle immunofilline.

Le immunofilline sono recettori proteici enzimatici che si legano con alta affinità a determinate sostanze e comprendono: a) la ciclofillina bersaglio della ciclosporina, b) l'FK506 BD capace di interagire sia con tacrolimus che con sirolimus, c) le parvulline.

Tali complessi immunofillina-farmaco risultano potenti inibitori dell'attività peptidil propil cis/trans isomerasica o rotamasica.

Ciclosporina e tacrolimus, legati alla loro specifica immunofillina agiscono successivamente andandosi a legare alla calcineurina ed inibendone la sua attività fosfatase sul NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), cui fa seguito la mancata traslocazione di tale fattore di trascrizione dal citosol al nucleo, con conseguente blocco dei meccanismi di attivazione a livello della regione "promoter" del gene dell'interleuchina 2 (IL-2).

Nonostante le analogie strutturali e l'interazione con lo stesso recettore del tacrolimus (FKBP-12), la rapamicina agisce con meccanismo completamente differente dai farmaci detti inibitori della calcineurina.

La rapamicina infatti, una volta legatasi al recettore citoplasmatico FKBP-12, interagisce con il complesso proteico definito mTOR bloccandone le sue funzioni.

Il meccanismo d'azione del Sirolimus è stato compreso solo successivamente alla scoperta della sua attività immunosoppressiva grazie ai dati ottenuti dal gruppo di Heitman nel 1991 e alle scoperte del gruppo di Abraham risalenti al 1995.

Meccanismo d'azione della rapamicina

Il target della Rapamicina (TOR) è stato originariamente descritto come una serina/treonina chinasi di 189 kD, potentemente inibita dalla rapamicina stessa.

La rapamicina interferisce con la segnalazione mediata da TOR tramite il legame con FKBP12, impedendo quindi il legame di TOR con i bersagli a valle [102].

È stato dimostrato come mTOR sia in grado di integrare numerosi segnali critici per la regolazione del metabolismo e della sopravvivenza cellulare [103] e come esso sia costitutivamente espresso e regolato nella fase post-tasduzionale.

Lavori scientifici che hanno utilizzato la rapamicina per indagare il *pathway* di mTOR hanno rivelato il suo coinvolgimento nella segnalazione mediata dall'insulina, da fattori di crescita e da amminoacidi [104].

La fosforilazione di substrati a valle della cascata di segnalazione, da parte di mTOR, previene l'apoptosi, determina la riorganizzazione dell'actina e l'inizio della biogenesi dei ribosomi, induce la fase della traduzione ed influenza positivamente la transizione dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare.

L'allestimento di colture cellulari con la rapamicina determina l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1, l'inibizione della traduzione e dell'assemblaggio dei ribosomi e la soppressione del metabolismo [105].

L'attivazione di mTOR procede mediante due distinti complessi di segnalazione, TORC1 e TORC2, ognuno dei quali costituito dall'associazione di mTOR e altre proteine [106]. TORC1 è un complesso rapamicina-sensibile, rappresentato da una piccola GTPasi, denominata Rheb, posta a monte (segnale positivo), dalla subunità adattatrice GβL, da mLST8 e da PRAS40. In aggiunta a queste, una proteina di peso molecolare di 150 kDa, la proteina regolatrice associata a TOR (raptor), è responsabile della facilitazione della fosforilazione dei substrati da parte della chinasi mTOR. Numerosi substrati a valle di TORC1 sono conosciuti e altrettanti rimangono da scoprire, tuttavia i più sfruttati negli studi sono la chinasi ribosomiale S6 (S6K1) e il soppressore della traduzione 4E-BP1.

TORC1 è coinvolto nella regolazione della crescita cellulare tramite il controllo della traduzione, della trascrizione e del trasporto cellulare.

Nel 2004 venne individuato un secondo complesso di segnalazione, denominato TORC2, inizialmente considerato non sensibile alla rapamicina. Successivamente

è stata dimostrata una interruzione nella via di segnalazione mediata da TORC2 in seguito ad un trattamento protratto con la rapamicina [107].

TORC2 consiste di una proteina a monte rappresentante un segnale positivo, mSin1, della subunità adattatrice G β L e di due ulteriori proteine dette mLST8 e protor [108].

Una proteina di 200 kDa non responsiva alla rapamicina, denominata rictor, forma un complesso con TORC2.

TORC2 regola gli aspetti spaziali della crescita cellulare tramite la sua azione sull'actina. Interviene inoltre nella fosforilazione di Akt a livello della serina in posizione 473 [109], determinando la sua completa attivazione con conseguente fosforilazione dei bersagli molecolari a valle di Akt [110].

Di particolare interesse è la posizione di Akt sia a monte che a valle di mTOR. A monte di mTOR, la fosforilazione di PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi) porta all'attivazione di Akt.

PI3K attiva parzialmente Akt [111] tramite la fosforilazione a livello di un particolare sito di legame (treonina 308), a sua volta Akt è in grado di facilitare l'attivazione di mTOR tramite la fosforilazione ed inattivazione di TSC1 e TSC2 (*tuberous sclerosis complex*).

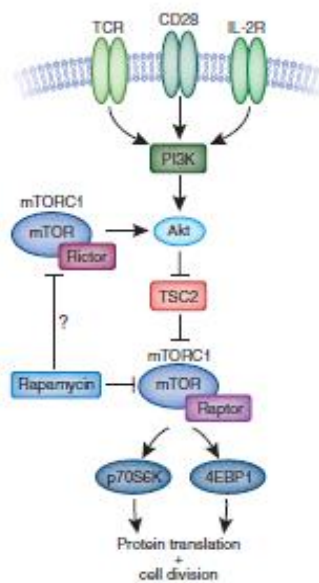


Fig. 5: Via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR (*THE EVOLVING ROLE OF MTOR INHIBITION IN TRANSPLANTATION TOLERANCE – McMahon G, J Am Soc Nephrol 2011;22: 408–415*)

In conclusione il riconoscimento antigenico dal parte del TCR in presenza della co-stimolazione di CD28, porta alla fosforilazione di PI3K. PI3K attiva Akt, che a sua volta inibisce TSC2, permettendo la formazione del complesso mTOR/raptor (mTORC1). mTORC1 agisce fosforilando la chinasi p70S6 e 4EBP1, determinando un incremento della traduzione proteica.

L'associazione di rictor ed mTOR porta alla formazione del secondo complesso, TORC2, che va a fosforilare Akt attivandolo.

Il legame di IL-2 con il proprio recettore è in grado a sua volta di attivare il *pathway* di segnalazione PI3K/mTOR.

La rapamicina impedisce la formazione del complesso mTORC1 con conseguente inibizione della proliferazione dei linfociti T.

In talune situazioni, soprattutto nel caso di alcuni tipi cellulari, e non esclusivamente in seguito ad un trattamento a lungo termine, la rapamicina sembrerebbe essere in grado di interferire con mTORC2, inibendone l'attività [112].

Rapamicina ed anergia

I linfociti T *naive*, entrati in contatto con un antigene, richiedono un segnale di co-stimolazione perché l'attivazione sia completa. Nel caso in cui il TCR venga stimolato in assenza di co-stimolazione, le cellule T non risultano in grado di proliferare né di produrre IL-2 e rimangono non responsive alla successiva stimolazione da parte dello stesso antigene [113]. Tale stato, detto di anergia, gioca un ruolo importante nei meccanismi di tolleranza agli antigeni *self* e nel prevenire l'autoimmunità.

Come conseguenza, un protocollo immunosoppressivo che induca anergia nelle cellule T reattive del donatore, potrebbe essere in grado di garantire una tolleranza a lungo termine, nel ricevente, nei confronti dell'organo trapiantato.

L'inibizione del complesso mTOR da parte della rapamicina, induce anergia nelle cellule T reattive [114].

Cellule T stimulate *in vitro* con rapamicina, anche se in presenza di costimolazione TCR/CD28/IL-2R, diventano anergiche e incapaci di produrre IL-2, nonostante ripetute stimolazioni antigeniche [115]. La funzione di

fosforilazione del complesso mTOR attivato, risulta significativamente ridotta nei linfociti T anergici.

Questa condizione di anergia diventa reversibile nel caso in cui le cellule vengano trattate con IL-2 esogena [116], tramite un meccanismo mTOR dipendente.

Tuttavia quando queste stesse cellule vengono stimolate con IL-2 ma in presenza di rapamicina lo stato di anergia risulta essere non reversibile [117].

Per contro gli inibitori delle calcineurine inibiscono, *in vitro* [118], l'induzione di anergia clonale nelle cellule T, anche quando trattate simultaneamente con rapamicina [119].

Effetti sovrapponibili sono stati evidenziati *in vivo*.

Il trattamento con rapamicina durante la stimolazione antigenica, induce anergia clonale in cellule T di topo. Tale effetto viene osservato anche in presenza del blocco di CTLA-4, molecola in grado di prevenire l'induzione di anergia [120]. È stato osservato, in modelli di topo, come la rapamicina in associazione al blocco della co-stimolazione, mediato da CTLA-4 Ig e anti-CD40L, sia in grado di permettere una sopravvivenza a lungo termine di trapianti di cute. Successivi trapianti di cute originari dello stesso donatore vennero accettati dal ricevente, la cute di terzi donatori venne al contrario rigettata. Il trattamento non in associazione con rapamicina, blocco della costimolazione o ciclosporina porta ad un rapido rigetto dell'organo trapiantato [121].

Rapamicina e T_{REG}

L'effetto positivo della rapamicina sulla proliferazione e sopravvivenza dei T regolatori suggerisce un intervento diretto del farmaco nell'induzione della tolleranza immunitaria.

Tale effetto è evidente in letteratura da tempo ed è stato dimostrato sia *in vivo* che *in vitro*.

Venne osservato come in topi trattati con una combinazione di IL-2, un antagonista di IL-15 e rapamicina, si potesse ottenere un incremento dell'apoptosi a carico dei linfociti T circolanti effettori ed un contestuale aumento della percentuale di cellule T CD4⁺, CD25⁺ [122].

Studi successivi dimostrarono che il trattamento con rapamicina era in grado di determinare sia *in vitro* che *in vivo*, l'espansione della popolazione di T_{REG}; tali

cellule risultavano inoltre anergiche e mantenevano la loro funzione di soppressione [123].

È interessante invece notare come esperimenti effettuati su T_{REG} umani coltivati *in vitro* con ciclosporina abbiano dimostrato la perdita della loro funzione di repressione in 48h.

Nonostante la funzione della rapamicina di preservare tale *subset* di cellule, quando i topi venivano trattati anche con ciclosporina, il numero dei T_{REG} e la maturazione dei linfociti Foxp3⁺ timici risultava significativamente ridotta.

L'effetto della rapamicina sui T_{REG} non si esaurisce solamente in quanto sopra citato, ma consiste anche nell'induzione della differenziazione periferica delle cellule T *naive* verso T_{REG}.

Quando le cellule Foxp3⁻ vengono attivate *in vitro*, il 2-3% di queste esprime Foxp3 e sviluppa un fenotipo regolatore. Nel caso in cui invece, tali cellule vengano stimulate, *in vitro*, con rapamicina, la percentuale delle cellule che esprimono Foxp3 aumenta fino al 7%.

Contrariamente a quanto avviene in presenza di rapamicina o TGFβ, la stimolazione con ciclosporina di cellule T attivate *in vitro*, non comporta l'incremento della percentuale della popolazione di T_{REG} [124].

Molteplici meccanismi sono in grado di spiegare l'azione della rapamicina sull'espansione dei T_{REG}. Uno di questi consiste nell'azione differenziale della segnalazione dipendente dal recettore di IL-2. Diversi *pathway* di segnalazione sono attivati in risposta al legame di IL-2 con il rispettivo recettore, inclusi, MAPK e PI3K/Akt/mTOR.

Nei linfociti regolatori, a causa dell'elevata espressione di PTEN a livello basale, la via JAK/STAT è indotta in modo preferenziale, al contrario l'attivazione della via PI3K/Akt/mTOR risulta ridotta rispetto ai T effettori [125].

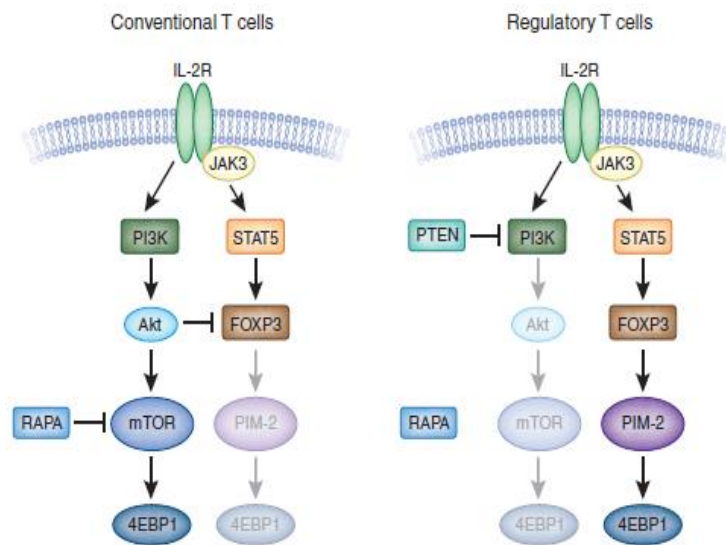


Fig. 6 Pathway di attivazione preferenzialmente attivati nei T reg/T conv in seguito a stimolazione con IL-2. (*THE EVOLVING ROLE OF MTOR INHIBITION IN TRANSPLANTATION TOLERANCE – McMahon G, J Am Soc Nephrol 2011;22: 408–415*)

Nei T_{REG}, STAT5 si lega al promotore di Foxp3, regolandone in tal modo l'espressione [126].

PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), un inibitore endogeno di PI3K, risulta costitutivamente espresso nei T_{REG}. Di conseguenza, quando il recettore di IL-2 viene stimolato, la via a valle di mTOR risulta minimamente attivata.

Nei T effettori, invece, la minima attività di PTEN, garantisce una piena attivazione della via PI3K/Akt/mTOR in risposta all'attivazione del recettore di IL-2 [127].

Il trattamento con rapamicina dunque inibisce nei T effettori la via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR, con conseguente effetto antiproliferativo, non esercitando invece, alcun effetto sui T_{REG}, che rimangono pressoché insensibili alla terapia in virtù della loro minima attivazione di tale via.

Semberebbe inoltre, che anche la sola attivazione di Akt sia controproducente al fine di preservare il *pool* di T_{REG}.

Cellule T *naive* trattate in vitro con IL-2 e TGFβ, mostrano un'induzione di Foxp3; quando invece Akt risulta *over*-espresso, l'espressione di Foxp3 è inibita. Tale effetto appare parzialmente reversibile in seguito al trattamento con rapamicina [128].

Questa osservazione suggerisce che la ridotta attivazione del *pathway* PI3K/Akt/mTOR nei T regolatori, assicuri la produzione di un livello sufficiente di Foxp3 tale da permettere la loro proliferazione e sopravvivenza.

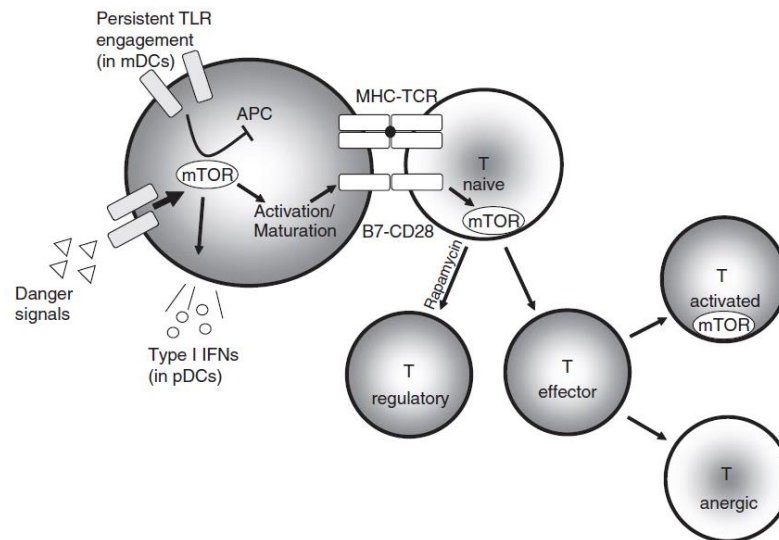


Fig. 7: I linfociti naive che vengono stimolati in un contesto di attivazione di mTOR, differenziano in cellule effettrici. Al contrario i T naive, stimolati dalle APC quando mTOR non è attivato oppure sotto trattamento con rapamicina, differenziano in T regolatori. (*mTOR: taking cues from the immune microenvironment, Delgoffe GM, Immunology, 2009 Aug, 127*)

Tra le altre funzioni, la rapamicina risulta anche essere in grado di influenzare l'espressione di fattori anti o pro-apoptotici. Cellule T regolatrici in coltura con rapamicina, dimostrano un'aumentata produzione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL. Elevati livelli della proteina pro-apoptotica Bax, vengono invece dimostrati nel caso dei linfociti T effettrici.

Il trattamento con rapamicina garantirebbe dunque ai T_{REG}, una resistenza relativamente maggiore all'apoptosi rispetto ai T effettrici [129].

Un terzo meccanismo tramite cui i T_{REG} risultano resistenti all'azione antiproliferativa della rapamicina, è mediato dalla via di segnalazione dipendente da Pim-2. Pim-2 è una serina-treonina chinasi che condivide con mTOR e Akt alcuni bersagli molecolari a valle, inclusi Bad e 4-EBP1 [130].

A livello dei T effettrici, Pim-2 risulta attivato in risposta alla stimolazione citochinica, tramite il *pathway* JAK/STAT. L'assenza di Pim-2 determina un'elevata sensibilità dei T effettrici alla rapamicina [131].

L'espressione di Pim-2 nelle cellule T_{REG} è regolata da Foxp3, in tal modo la proteina risulta costitutivamente prodotta [132].

Dunque la presenza costante di Pim-2 nei T_{REG} conferisce resistenza all'azione antiproliferativa della rapamicina, offrendo un *pathway* alternativo indipendente da PI3K/Akt/mTOR [133].

Rapamicina e cellule dendritiche (DC)

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule presentanti l'antigene che originano dal midollo osseo ed intervengono nella risposta immunitaria regolando le cellule T.

La natura di tale risposta è determinata dalle citochine prodotte dalle DC, dallo specifico MHC e dalle molecole di co-stimolazione espresse sulla loro superficie, differenti a seconda dello stato di maturazione.

Quando DC immature stimolano i linfociti T, questi ultimi sopprimono la risposta immunitaria inducendo anergia e apoptosi, promuovendo in questo modo, uno stato di tolleranza [134].

Anche DC semi-mature e mature sono in grado di espandere il *pool* di linfociti T regolatori. I T_{REG} espansi grazie all'azione delle DC risultano immunosoppressivi *in vivo* e sono in grado di prolungare la sopravvivenza di trapianti di cute e di prevenire la GHVD in modelli animali [135].

La via di segnalazione dipendente da mTOR svolge un ruolo importante nella maturazione e funzionalità delle DC.

La capacità di endocitosi [136] delle DC immature così come l'espressione di MHC di classe II e di molecole di co-stimolazione risulta inibita in seguito al trattamento con rapamicina [137].

Al contrario, il trattamento con tacrolimus, non ha alcun effetto sulla maturazione delle DC [138].

Cellule dendritiche trattate *in vitro* con rapamicina promuovono l'espansione del *pool* di T regolatori e, contrariamente a quanto accade per le DC non trattate, favoriscono la soppressione della risposta immunitaria T dipendente [139-140].

Risulta inoltre variabilmente influenzata la produzione di citochine: la secrezione di IL-10 e IL-12 da parte delle DC immature è significativamente ridotta mentre appare incrementato il livello di IL-2 secreto da parte delle DC mature [141] e inibita la produzione della citochina pro-infiammatoria IL-18.

In conclusione DC trattate con rapamicina potrebbero svolgere un ruolo non trascurabile nella prevenzione del rigetto dell'organo trapiantato.

Everolimus

L'Everolimus è un nuovo macrolide di sintesi, analogo strutturale della rapamicina, con cui condivide meccanismo d'azione ed alcuni effetti indesiderati.

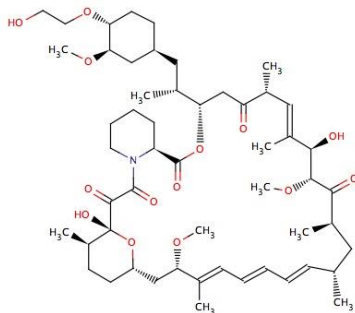


Fig. 8: Formula di struttura dell'everolimus

Rispetto alla rapamicina possiede una maggiore polarità e risulta più idrofilico, essendo stato sviluppato col fine di migliorare la farmacocinetica e la farmacodinamica del sirolimus. Nonostante la struttura chimica parzialmente sovrapponibile, l'everolimus dimostra una biodisponibilità maggiore e un minor legame con le proteine plasmatiche.

Questo permette al farmaco di impiegare un tempo minore per il raggiungimento dello *steady state* (4 giorni vs 7 giorni della rapamicina).

Come la rapamicina, l'everolimus blocca la proliferazione cellulare stimolata dai fattori di crescita e dalle citochine sia per quanto riguarda le cellule ematopoietiche che le cellule non ematopoietiche. Everolimus si lega ad un recettore citosolico, FKBP12, (*Fk binding protein*), appartenente alla classe delle immunofilline. Il complesso everolimus-FKBP12 interagisce con la sua molecola *target*, mTOR. Tale interazione si traduce in una potente inibizione del segnale di proliferazione cellulare e della traduzione degli mRNA richiesti per la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Agisce quindi in una fase tardiva del ciclo cellulare attraverso un meccanismo distinto da quello dei CNI.

In ambito di trapianto renale, l'Everolimus può essere impiegato in due condizioni: de novo oppure come terapia di mantenimento.

Nel caso di un trattamento de novo, viene utilizzato in associazione con un CNI al fine di minimizzarne le dosi fino, in alcuni casi, a sospenderlo completamente.

Come terapia di mantenimento viene aggiunto allo schema immunosoppressivo già impostato, in associazione ai CNI, al fine di ridurne i dosaggi per prevenire e/o arrestare la disfunzione renale cronica e la nefrotossicità CNI-associata.

I due studi autorizzativi internazionali sull'Everolimus (B251 e B201) sono stati effettuati agli inizi del 2000, allo scopo di valutare l'efficienza e la sicurezza di Everolimus nei confronti del Micofenolato Mofetile, nell'ambito di una triplice terapia con Ciclosporina e steroidi. In entrambi gli studi l'efficacia di Everolimus è risultata paragonabile a quella del micofenolato.

Uno studio successivo (B156) ha messo a confronto l'Everolimus in associazione a dosi standard o ridotte di Ciclosporina. Lo studio ha documentato un basso numero di rigetti in entrambi i bracci e un filtrato glomerulare più elevato nel gruppo di pazienti a dose ridotta di Ciclosporina. Alla luce di tali risultati, due nuovi studi hanno confermato l'efficacia e la sicurezza di Everolimus associato a basse dosi di Ciclosporina.

Recentemente un nuovo approccio immunosoppressivo è stato quello di associare dosi molto elevate di Everolimus a dosi molto ridotte di Ciclosporina, nell'intento di migliorare ulteriormente nel tempo la filtrazione glomerulare. Lo studio Everest ha dimostrato l'efficacia e la sicurezza di tale protocollo immunosoppressivo. I rigetti d'organo inoltre, sono risultati adeguatamente bassi, in assenza di effetti collaterali di rilievo.

Due categorie di pazienti in particolare si avvarrebbero della conversione ad Everolimus: pazienti con documentata tossicità renale da CNI e pazienti che sviluppano neoplasie nel post-trapianto.

CAP 4: TROMBOSPONDINA-1

La trombospondina-1 (TSP-1) è una glicoproteina della matrice cellulare, transitoriamente espressa a livello della matrice, in grado di modulare le funzioni

cellulari tramite il legame con recettori di superficie e altri componenti della stessa matrice extracellulare [142].

La TSP-1 risulta essere il componente maggiormente studiato della famiglia delle trombospondine, il quale comprende 5 proteine extracellulari multifunzionali leganti il calcio: TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4, TSP-5.

TSP-1 e TSP-2, strutturalmente simili, vengono espresse a livello della superficie cellulare durante determinati eventi fisiologici.

Inizialmente identificata all'interno degli α -granuli delle piastrine attivate [143], tutt'ora riconosciuti come più importante *pool* di deposito di TSP-1 preformata dell'organismo, tale proteina risulta essere espressa da innumerevoli tipi cellulari come cellule endoteliali, fibroblasti, adipociti, cellule muscolari lisce, monociti, macrofagi e cellule neoplastiche [144-145].

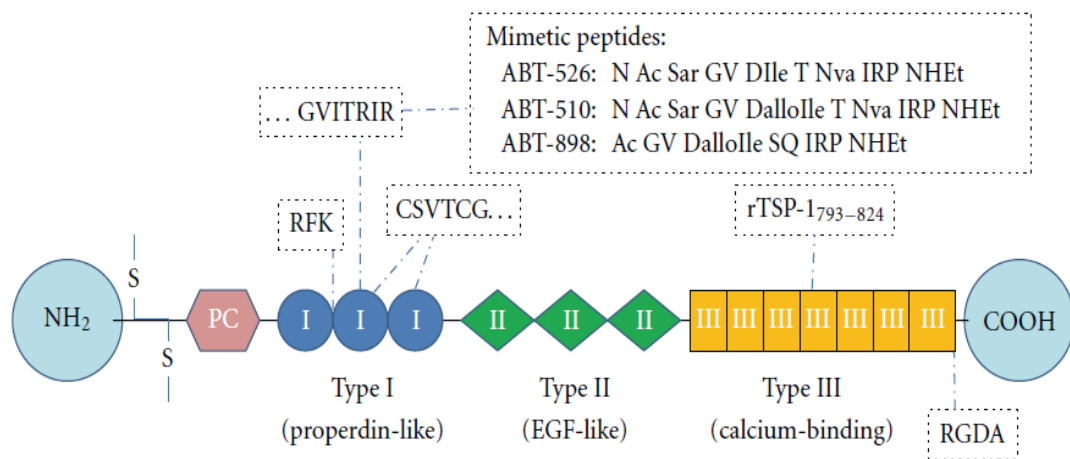


Fig. 9: Struttura molecolare della TSP-1

Tramite il legame con altre proteine della matrice, come la fibronectina, la TSP-1 viene inglobata all'interno della matrice extracellulare a livello della quale si ripiega e cambia conformazione.

La TSP-1 è una molecola omotrimerica di circa 420 kDa; ogni monomero è costituito di un legame disulfidico (S=S) intercatena, un dominio protocollagene (PC) e ripetizioni Tipo I, II, III.

La TSP-1 è in grado di legarsi, grazie a specifici domini, a proteoglicani, a proteine di membrana come integrine e altre proteine della matrice [146]. È

costituita da un dominio N-terminale globulare, che lega l'eparina e un dominio C-terminale globulare che lega il CD47.

Il dominio NH₂-terminale interagisce con LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*), proteina che ha funzione di rilasciare le metalloproteasi già legata alla TSP-1, modulando in tal modo l'attività proteasica [147]. I legami con proteoglicani e integrine sono invece responsabili del coinvolgimento della TSP-1 nelle funzioni di angiogenesi, chemiotassi, adesione, motilità cellulare [148].

Ognuno dei cinque membri della famiglia delle trombospondine possiede i domini ripetitivi Tipo II e III, ma solamente la TSP-1 contiene il dominio Tipo I [149]. Il dominio ripetitivo Tipo I, anche detto TSRs (*thrombospondin structural homology repeats*), inibisce l'angiogenesi grazie all'attivazione di CD36 e all'induzione dell'apoptosi nelle cellule endoteliali [150].

Il dominio di ripetizione tipo III è un dominio legante il calcio, contenente una sequenza amminoacidica che interagisce con l'elastasi attivando i neutrofilo [151-152]. Tra le altre funzioni inoltre impedisce il legame dell'FGF (*fibroblast growth factor*) alle cellule endoteliali riducendo i fenomeni angiogenetici [153].

Il dominio C-terminale si lega a CD47, anche conosciuto come proteina integrina-associata [154], interagisce con diverse integrine come $\beta 1$ e $\beta v6$ e permette l'adesione cellulare e lo *spreading* tramite il legame con alcuni proteoglicani [155].

Questa ed altre interazioni permettono alla TSP-1 di intervenire nei processi di angiogenesi, proliferazione cellulare e risposta immune.

La TSP-1 risulta essere tra i maggiori fattori attivanti il TGF $\beta 1$ (*transforming growth factor*), citochina coinvolta nella regolazione dei processi di riparazione delle ferite, formazione di matrice extracellulare, risposta immunitaria. Questa citochina multifunzionale è secreta a livello della matrice extracellulare nella sua forma inattiva, in virtù della sua associazione con LAP (*latency-associated peptide*) [156]. La funzione attivante della TSP-1 nei confronti di TGF è dovuta alla sequenza amminoacidica RFK localizzata a livello di TSR [157-158]. L'interazione tra TSP-1 e LAP determina il rilascio di TGF β nella sua forma matura, forma che andrà a legarsi alla TSP-1 stessa. Il legame con TSP-1 provoca la formazione di un complesso che comporta dei cambiamenti conformazionali a

livello della struttura di TGF β , rendendo possibile l'interazione della citochina con i propri recettori.

La proteina LAP risulta cruciale per l'attivazione di TGF β e ne regola inoltre molte delle sue funzioni.

Target recettoriali della TSP-1

I bersagli recettoriali maggiormente studiati, tramite cui la TSP-1 esercita le proprie funzioni sono rappresentati da CD36 e CD47.

CD36, noto anche come FAT (*fatty acid translocase*), è una proteina glicosilata appartenente alla famiglia dei recettori *scavenger* di classe B e svolge un ruolo determinante in numerosi processi fisiologici come il metabolismo degli acidi grassi e del glucosio.

Tale recettore si trova espresso sulla superficie di diversi tipi cellulari ed è in grado di legarsi a diversi ligandi, inclusa la TSP-1 [159-160].

Come conseguenza del legame con la TSP-1, CD36 dimerizza diventando attivo e viene coinvolto nei processi di trasduzione del segnale [161].

Le funzioni di adesione ed anti-angiogenetiche della TSP-1 sono state, alla luce di quanto riportato sopra, attribuite in gran parte all'interazione con CD36.

CD47 è una proteina integrale di membrana con un dominio extracellulare IgV, espressa a livello delle cellule endoteliali e delle cellule circolanti nel torrente ematico, tra cui i linfociti T a livello dei quali la sua attivazione incrementa l'espressione della TSP-1. Svolge inoltre un ruolo critico nel processo di migrazione dei leucociti attraverso le barriere endoteliali ed epiteliali [162].

CD47 ha funzione di recettore per la TSP-1, legandosi al dominio C-terminale della proteina [163]. Tramite l'attivazione del *pathway* dipendente da CD47, la TSP-1 è in grado di indurre l'apoptosi nei leucociti.

L'espressione del CD47 nei granulociti apoptotici può influenzare la funzione di fagocitosi dei macrofagi, a livello dei siti di infiammazione, suggerendo un ruolo critico di tale fattore nella risoluzione del processo infiammatorio.

Tale interazione, in aggiunta a quanto sopra citato, permette la regolazione delle funzioni dell'NO. Grazie alla modulazione degli effetti di tale biogas, la TSP-1 risulta quindi, essere implicata nei processi di vasodilatazione e chemiotassi [164].

Il CD47 inibisce l'azione dell'NO a livello vascolare anche in presenza di concentrazioni molto basse, ma fisiologiche, di TSP-1.

Tramite l'attivazione di cGMP a livello delle cellule muscolari lisce, la via di segnalazione NO/cGMP stimola l'angiogenesi aumentando la proliferazione cellulare e la chemiotassi [165]. Tale via è inoltre in grado di limitare l'attivazione piastrinica mediante la fosforilazione cGK1-dipendente di target che riducono l'attivazione dell'integrina piastrinica $\alpha\beta 3$.

La TSP-1 a concentrazioni picomolari, inibisce l'attivazione di cGC (*guanylyl cyclase*) mediata dall'NO nelle cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, piastrine e cellule T.

L'inibizione dell'attivazione di cGC può essere ottenuta anche grazie al legame CD36-TSP-1, seppur ad elevate concentrazioni di TSP-1 ed esclusivamente nelle cellule che co-esprimono il CD47.

In conclusione, livelli fisiologici di TSP-1 limitano in modo significativo la via di segnalazione NO/cGMP, anche grazie alla regolazione della NO sintetasi e CD47 risulta essere il recettore maggiormente implicato nella mediazione di tale effetto.

Di recente è stato riportato come il CD47 sia in grado di associarsi a VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor*) [166], inibendone la fosforilazione e quindi la successiva angiogenesi, come conseguenza dell'interazione con TSP-1 o altri ligandi.

TSP-1 e infiammazione acuta

La TSP- 1 viene transitoriamente rilasciata durante le prime fasi del processo infiammatorio acuto e tale processo è regolato da multipli fattori. Espressa ad elevati livelli nei neutrofili, induce un'intensa risposta immunitaria a livello dei tessuti infiammati [167].

La TSP-1 viene secreta in risposta al processo infiammatorio, promuovendo la risoluzione della condizione di infiammazione stessa e facilitando la fagocitosi delle cellule danneggiate [168-169].

Il processo di fagocitosi macrofagica delle cellule apoptotiche viene mediato dalla TSP-1 tramite l'azione del CD36, che viene co-espresso in associazione alla TSP-1 dalle cellule endoteliali e dai macrofagi.

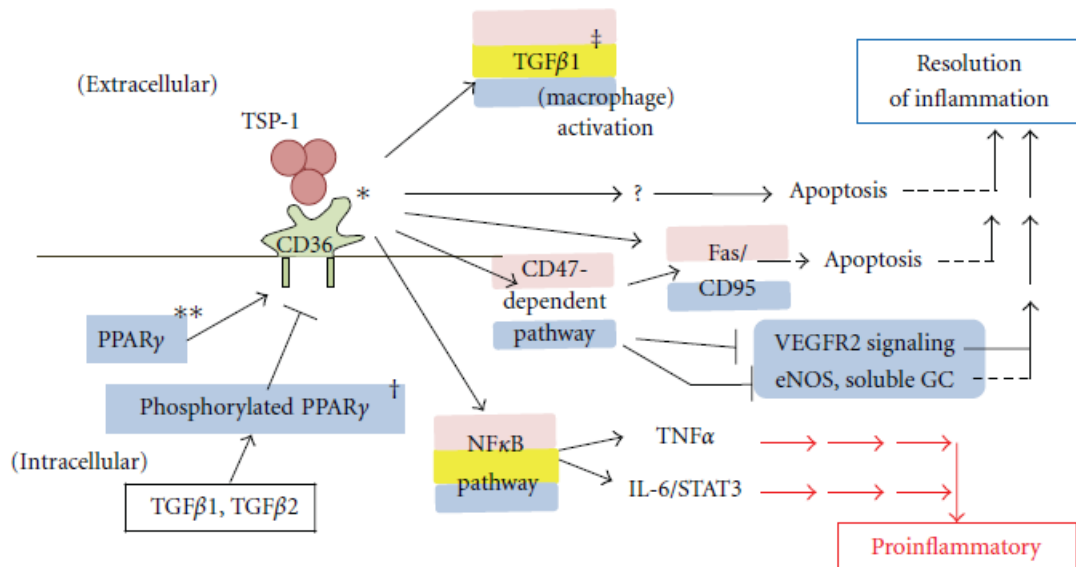


Fig. 10: CD36/TSP-1: interazione nel processo infiammatorio

Grazie all'attivazione del CD36, TSP-1 risulta inoltre in grado di controllare il flusso sanguigno e l'infiltrazione linfocitaria, modulando la via di segnalazione NO-dipendente a livello dei tessuti danneggiati [170].

Come già citato, la TSP-1 inibisce la guanilato ciclasi espressa nelle cellule endoteliali e dunque l'attivazione dell'NO, tramite l'interazione con CD36 e CD47 [171]. Tale processo esita infine nell'inibizione dell'adesione e attivazione leucocitaria all'endotelio e nella riduzione dell'angiogenesi [172].

Un ulteriore fattore in grado di interagire con la TSP-1 durante la fase acuta dell'infiammazione è PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), membro della famiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione. Quando PPAR non viene espresso, la TSP-1 risulta secreta ad elevati livelli [173].

PPAR inoltre aumenta notevolmente l'effetto anti-apoptotico del peptide ABT510 [174], derivato dalla regione TSR della TSP-1 che agisce inducendo apoptosi nelle cellule dell'endotelio vascolare sia in vivo che in vitro, grazie all'interazione con CD36 [175].

La stimolazione con un agonista di PPAR determina l'aumento dell'espressione di CD36 nelle cellule endoteliali, migliorando gli effetti anti-angiogenetici di ABT510 [176].

TSP-1 e infiammazione cronica

Durante le prime fasi del processo infiammatorio elevati livelli di TSP-1 incrementano le funzioni di tolleranza delle DC, permettendo la risoluzione della condizione infiammatoria. La TSP-1 può modulare tale processo, inibendo o aumentando la secrezione della citochina IL-10 e quindi regolando la funzione delle DC [177]. Tale effetto è dimostrato dall'upregolazione della TSP-1 intracellulare in DC stimulate con IL-6, IL10 o TGFβ [178].

In modelli di trapianto di cornea è stato inoltre dimostrato come TSP-1 sia in grado di inibire la funzione delle APC sopprimendo la loro capacità di sensibilizzare le cellule T nell'ospite [179].

In aggiunta a quanto detto, la via di segnalazione TSP-1/CD47 interviene nel processo di attivazione delle cellule T [180-182], promuovendo in particolar modo quella dei linfociti T regolatori. Risulta evidente dunque come la TSP-1 sia efficace nel contenere la risposta immunitaria sia grazie all'inibizione dei linfociti T effettori sia tramite l'induzione dell'apoptosi negli stessi linfociti. Mediante l'induzione di un fenotipo regolatore, CD47 risulta dunque, implicato nel mantenimento della tolleranza immunitaria [183].

Il processo infiammatorio può essere modulato dalla TSP-1 anche grazie al suo legame con CD36, tramite l'attivazione dei macrofagi e l'induzione della fagocitosi [184].

Anche l'effetto anti-angiogenetico della TSP-1 riveste un ruolo di significativa importanza nella cronicizzazione del processo infiammatorio, essendo l'angiogenesi un componente attivo in tale processo [185].

Tuttavia nonostante le funzioni immunomodulanti, la TSP-1 può favorire, in alcune condizioni, l'evoluzione in fibrosi e l'induzione di apoptosi a causa dell'attivazione del TGFβ [186]. La sua interazione con TGFβ determina infatti, un incremento del processo fibrotico e del danno preesistente a carico del rene.

Risulta inoltre espressa nei quadri di glomerulopatie [187].

È stato dimostrato come lo sviluppo della nefropatia diabetica sia attenuato in topi *Knock-out* per la TSP-1, con evidente riduzione della produzione di matrice glomerulare, del danno podocitario, dell'infiltrazione leucocitaria e dell'alterazione dei parametri renali di funzionalità [188].

In conclusione è possibile affermare che la TSP-1 rivesta sia una funzione anti-infiammatoria che pro-infiammatoria, a causa dell'interazione con multipli recettori o per la presenza di specifiche proteine della matrice cellulare a livello dei tessuti danneggiati. Appare però evidente come tale proteina sia generalmente riscontrata ad elevate concentrazioni nei processi infiammatori e solo in alcune situazioni agisca come agente pro-infiammatorio. Gli effetti della TSP-1, inoltre, possono essere conseguenza sia di un meccanismo bifasico che dose-dipendente.

TSP-1 e T regolatori

È ormai noto che la TSP-1 eserciti sia un effetto di stimolazione che di inibizione sulle cellule T, mediati rispettivamente da due recettori: $\alpha 4\beta 1$ e CD47. Tuttavia la TSP-1 risulta essere prevalentemente, un inibitore della segnalazione dipendente dal TCR [189] e della capacità di risposta a IL-2 delle cellule T *naive* e mature [190-191].

Il legame della TSP-1 con CD47 esposto su cellule T *naive* determina lo sviluppo di cellule T anergiche in grado di produrre una scarsissima quota di citochine come IL-2, IL-4, IL-5, IL13 e INF- γ . Di grande interesse è inoltre notare come tali cellule dimostrino di assumere un fenotipo regolatore, sopprimendo la proliferazione e inibendo la produzione di citochine dei Th0, Th1 e Th2 [192]. I tre *marker* convenzionalmente espressi dai T_{REG}, quali GITR, CTLA-4 e OX40, sono risultati essere infatti, *up*-regolati e la percentuale di linfociti CD4⁺,CD25⁺ e Foxp3⁺ è risultata notevolmente elevata.

Nonostante si possa supporre il contrario, l'interazione TSP-1/CD47, dimostra di poter promuovere lo sviluppo di cellule regolatrici, in grado di esprimere notevoli quantità di Foxp3, anche in assenza di un *pool* preesistente di cellule *naive* CD4⁺, CD25⁺. Recentemente è stato provato infatti, come l'induzione di tali cellule T anergiche e regolatrici avvenga tramite il legame della TSP-1 con CD47 espresso sulla superficie di cellule T *memory* CD45RA⁺ CD25⁻ e non richieda la presenza di T *naive* CD4⁺,CD25⁺ e Foxp3⁺. Tuttavia non è da escludere la possibilità che

l'interazione CD47/TSP-1 possa favorire l'espansione di un *pool* di cellule Foxp3⁺ preesistente timo-derivate.

Sulla base di tali osservazioni, è dunque possibile affermare la capacità della TSP-1 di promuovere la generazione di linfociti T_{REG} GITR⁺ CTLA-4⁺ OX40⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ mediante il legame con CD47 espresso sulla superficie di cellule T *naive* CD4⁺CD25⁻ o di cellule T *memory*.

La TSP-1 prodotta a livello linfonodale, principalmente da parte di cellule dendritiche, induce la conversione dei T *naive* CD4⁺CD25⁻ in T_{REG}, in grado di controllare negativamente il processo infiammatorio sia negli organi linfoidi che nei siti di infiammazione.

Alcuni studi hanno riportato come i T_{REG} siano in grado di esercitare la loro attività di soppressione mediante un meccanismo dipendente dal TGFβ, sia come molecola secreta sia come molecola legata alla membrana. È stato inoltre provato che l'induzione dei iT_{REG} in periferia sia mediata dall'azione del TGFβ.

Linfociti T entrati in contatto con le cellule dell'epitelio pigmentato dell'occhio acquisiscono un fenotipo regolatore tramite un meccanismo dipendente da TGFβ. TGFβ legato alla membrana dell'epitelio pigmentato dell'iride, interagisce con i recettori presenti sulla superficie delle cellule T, promuovendo la conversione dei linfociti T CD8⁺ in T_{REG}. Per contro la forma solubile della molecola, prodotta dallo stesso epitelio pigmentato determina l'induzione di T_{REG} a partire da cellule T CD4⁺ [193]. È possibile ipotizzare una forma di TGFβ associata alla membrana in quanto legata alla TSP-1, prodotta dalle cellule dell'epitelio pigmentato e dai linfociti T regolatori indotti dal contatto con lo stesso epitelio.

Come già riportato sopra la TSP-1 risulta essere un fattore essenziale per l'induzione dei linfociti regolatori e la soppressione dei linfociti T circolanti [194].

È stato tuttavia dimostrato come, nonostante la TSP-1 sia la molecola di maggior importanza nell'attivazione del TGFβ, l'induzione dei T_{REG} grazie all'interazione TSP-1/CD47, avvenga in modo diretto e non richieda la presenza TGFβ.

Dunque sia TGF β che TSP-1 e IL-10, quando rilasciati in un contesto di infiammazione, agiscono in concerto promuovendo la generazione di T regolatori periferici.

Conseguentemente ad una condizione di danno renale acuto è possibile osservare un incremento dell'espressione dell'mRNA per TSP-1, TGF β e Foxp3 [195-196]. Sorprendentemente Foxp3 appare significativamente correlato con lo sviluppo di un quadro di rigetto acuto ed elevati livelli dello stesso predicono una risoluzione del processo.

TSP-1 ed mTOR inibitori

È stato riportato dal gruppo di Camussi nel 2006, come il *pathway* PI3K/Akt svolga un ruolo di regolatore negativo dell'espressione della TSP-1.

A dimostrazione di ciò, cellule endoteliali tumorali sono state incubate con due diversi inibitori di PI3K (LY294002 e Wortmaninn). Entrambi gli inibitori hanno dimostrato di essere in grado di incrementare la produzione e il rilascio di TSP-1 da parte di tali cellule endoteliali.

In considerazione della posizione di mTOR a valle della via di segnalazione PI3K/Akt, è stato testato l'effetto sulla produzione di TSP-1 anche dell'inibitore di mTOR, rapamicina. È stato successivamente provata la capacità della rapamicina di aumentare la produzione di TSP-1 e di indurre il rilascio dose-dipendente da parte delle cellule endoteliali tumorali [200].

TSP-1 e danno da ischemia-riperfusion

Per danno da ischemia-riperfusion si intende il processo successivo ad un'ischemia, provocato dal ripristino dell'irrorazione sanguigna nel tessuto danneggiato. Consiste dunque, nella condizione che si viene a creare immediatamente dopo al trapianto dell'organo, nel ricevente.

La condizione ischemica porta alla riduzione della quota disponibile di ATP e all'accumulo di metaboliti tossici, mentre la riperfusion determina la produzione specie reattive dell'ossigeno (ROS) [201]. Le alterazioni nel metabolismo cellulare derivanti e la generazione di metaboliti tossici contribuiscono al danneggiamento del tessuto, caratterizzato dalla presenza di aree necrotiche ed apoptotiche [202-203].

La TSP-1 risulta essere la proteina maggiormente espressa a 3 h dalla riperfusione del rene in modelli di ratto e di topo per poi ritornare ai livelli basali dopo 48h. L'induzione della TSP-1, precedente all'attivazione di p53, induce cambiamenti proapoptotici nelle cellule renali. L'espressione della TSP-1 precedente all'*up*-regolazione di p53 suggerisce un'attivazione non mediata da tale fattore nel contesto dell'ischemia-riperfusione nel rene trapiantato, come invece avviene nelle cellule endoteliali e tumorali [204].

L'espressione della TSP-1 è risultata essere localizzata prevalentemente a livello delle porzioni di tubulo caratterizzate dai maggior cambiamenti morfologici determinati dal danno cellulare [205-206].

CAP 5: CELLULE STAMINALI PROVENIENTI DAL MIDOLLO OSSEO

Il ruolo delle cellule staminali nella riparazione del danno tissutale è stato messo in evidenza da numerosi studi, rendendo sempre più concreta l'ipotesi di utilizzarle nel prossimo futuro quale terapia di differenti patologie.

Le cellule staminali nell'adulto sono indispensabili per garantire la rigenerazione di differenti organi e tessuti (come la cute, l'intestino, il sistema ematopoietico), che per mantenere la loro omeostasi si servono di un elevato turn-over cellulare. Altri organi come il rene, il polmone, il muscolo scheletrico e il fegato hanno un più lento turn-over cellulare; ciò nonostante, in seguito ad un danno, anche in questi organi si osservano processi di reclutamento, proliferazione e differenziazione delle cellule staminali.

Tali cellule hanno la capacità di aut rigenerarsi e differenziare in diverse varietà cellulari [297]. In particolare diversi studi hanno evidenziato la caratteristica plasticità di cui sono dotate le cellule staminali provenienti dal midollo osseo, capaci di differenziare in differenti tessuti [297, 298]. Sono state isolate cellule staminali residenti in molteplici organi quali il sistema nervoso centrale [299], la retina [300], il muscolo scheletrico [301], il fegato [302] e il rene [90]. Le cellule staminali residenti generano differenti tipi cellulari preferenzialmente del loro tessuto d'origine a testimoniare un loro ruolo pregnante nella crescita post natale dell'organo stesso, nel garantire il fisiologico turn over cellulare e la riparazione

tissutale.

Nel midollo osseo si ritrovano due tipi di cellule staminali: le cellule staminali mesenchimali (MSCs), che risiedono nel compartimento stromale del midollo osseo e le cellule staminali ematopoietiche (HSCs). Le MSCs sono cellule staminali adulte di origine mesodermica, che hanno la capacità di differenziare in cellule del tessuto connettivo, quali tessuto adiposo, osso, cartilagine e muscolo [298]. Le HSCs sono cellule indifferenziate, capaci di rigenerarsi e di differenziare in cellule altamente specializzate del compartimento ematico, quali eritrociti, leucociti e piastrine.

Nonostante siano state scoperte molte caratteristiche di queste rare cellule del midollo osseo, non si è ancora arrivati alla loro piena conoscenza e non sono ancora stati identificati dei makers specifici di tali cellule [304].

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs), che sono definite anche cellule staminali mesenchimali stromali multipotenti [320], sono una popolazione eterogenea di cellule con morfologia simil-fibroblasti, che *in vitro* hanno la capacità di formare colonie e possono differenziare in tessuto osseo, cartilagine e tessuto adiposo [321]. (Fig. 11).

Le MSCs, almeno *in vitro*, non hanno dei markers specifici. Secondo una codifica internazionale le MSCs per essere definite tali non devono esprimere i marcatori ematopoietici CD45, CD34 e CD14 né le molecole di co-stimolazione CD80, CD86 e CD40, mentre solitamente esprimono livelli variabili di CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, i gangliosidi GD2 e CD271 e sono riconosciute dall'anticorpo monoclonale STRO-1.

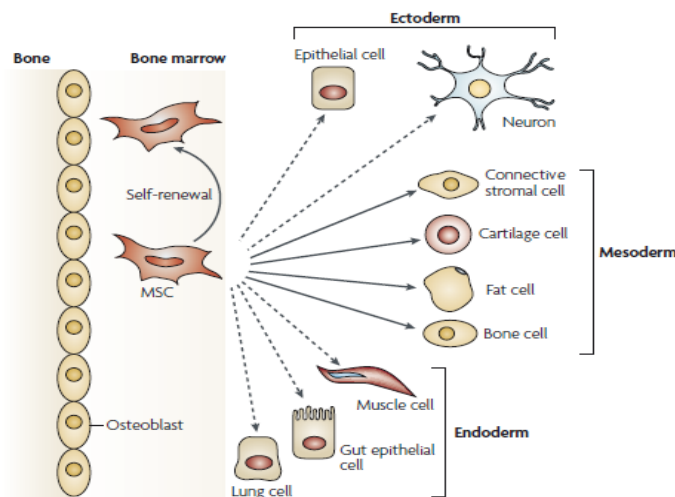


Fig. 11: La multipotenzialità delle MSCs (*Uccelli et al., Nature Reviews Immunology 2008; 8:726-736*)

Le cellule ematopoietiche sono mantenute in uno stato di quiescenza nel midollo osseo fintanto che, dopo stimolo appropriato, differenziano e vengono rilasciate nel sistema vascolare sinusoidale. Nel midollo osseo le HSCs e i loro progenitori sono sostenute dalle cellule stromali della nicchia (Fig. 12). Nei topi sono stati descritti due tipi di nicchie. La “nicchia endostale”, formata da osteoblasti che costeggiano la superficie endostale dell’osso trabecolare e la “nicchia vascolare” che è composta da cellule endoteliali e da cellule stromali sub-endoteliali CD146+ che si localizzano lungo la parete esterna dei capillari sinusoidali del midollo osseo. Le cellule stromali in entrambi i tipi di nicchia provvedono a creare un microambiente che favorisce il mantenimento e l’autorigenerazione delle HSCs difendendole dagli stimoli differenziativi e pro-apoptotici, garantendo sempre una riserva di HSCs. Inoltre le nicchie controllano la proliferazione e la differenziazione delle HSCs e il rilascio dei progenitori giunti a maturazione nel sistema vascolare.

Quindi la regolazione della quiescenza delle HSCs, attraverso il loro mantenimento nella fase G0 del ciclo cellulare e il controllo della loro proliferazione, differenziazione e migrazione nel sistema vascolare è di pertinenza delle cellule stromali del midollo osseo [323, 324]. (Fig. 12)

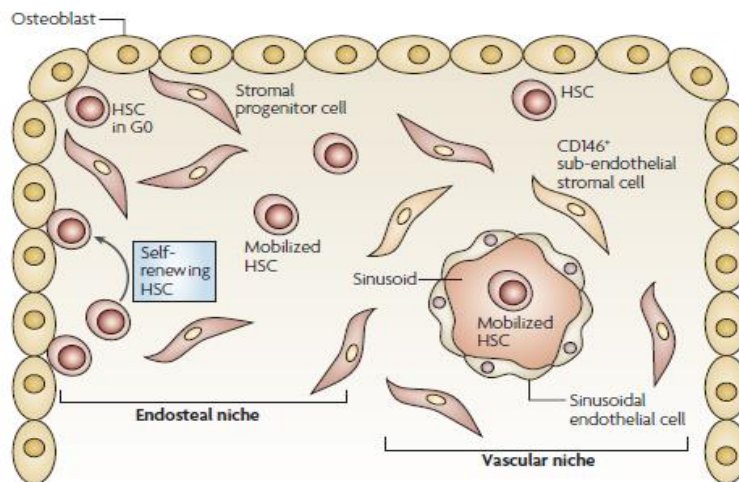


Fig. 12: Le cellule stromali della nicchia. (Uccelli et al., *Nature Reviews Immunology* 2008; 8:726-736)

Fonti di MSCs

La principale fonte di MSCs è il midollo osseo. Tuttavia queste cellule rappresentano solo una minima percentuale del numero totale di cellule residenti nel midollo. Pittenger et al. hanno dimostrato che solo dallo 0.0001% allo 0.01% delle cellule mononucleate isolate tramite gradiente di densità danno origine a colonie simil-fibroblasti e possono essere classificate come MSCs [325].

Oltre che nel midollo osseo le MSCs sono localizzate in molti altri tessuti del corpo umano. C'è un numero crescente di lavori che descrivono la loro presenza nel tessuto adiposo, nel cordone ombelicale, nei villi corionici della placenta, nel liquido amniotico, nel sangue periferico, nel fegato fetale, nel polmone e persino nei denti decidui [326]. Recentemente è stato osservato che nel tessuto adiposo è presente una popolazione di cellule stromali con un potenziale multilineare [327]. Proprio come le MSCs che originano dal midollo osseo anche quelle derivanti dal tessuto adiposo possono differenziare *in vitro* sia nella linea mesenchimale che ectodermica [328]. Inoltre da colture di cellule dell'osso trabecolare di origine umana si possono isolare osteoblasti capaci di differenziare in tre differenti linee cellulari. Sono state inoltre isolate dal tessuto muscolare scheletrico dei progenitori mesenchimali, che hanno caratteristiche diverse dalle cellule muscolari satellite e che sono considerate cellule staminali muscolari. Il numero di MSCs si riduce progressivamente con l'età del soggetto (raggiungendo il picco

massimo in epoca neonatale e riducendosi a circa un centinaio a 80 anni) [329].

Proprietà immunomodulanti e rigenerative delle MSCs

Le capacità immunomodulanti delle MSCs si esplicano nei seguenti modi:

- Inibiscono la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T effettori (Th1 e Th2) attraverso il contatto diretto cellulare e il rilascio di mediatori solubili
- Inducono la proliferazione e l'attivazione dei T regolatori esprimenti FoxP3, CD4, CD8 e delle cellule TGFβ e IL10+
- Inibiscono la maturazione e la migrazione nei linfonodi delle cellule dendritiche, esprimendo capacità immunodepressive
- Stimolano lo shift dei macrofagi da fenotipo effettore a fenotipo regolatore

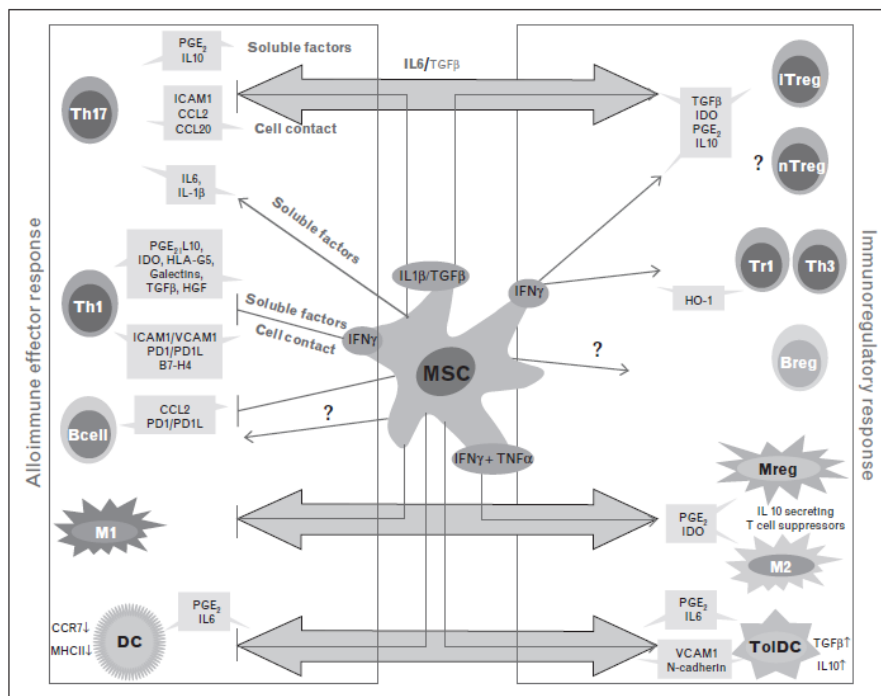


Fig. 13: Proprietà immunomodulanti delle MSCs (Franquesa et al., 2012 *Co-transplantation* 2012; 17:355-361)

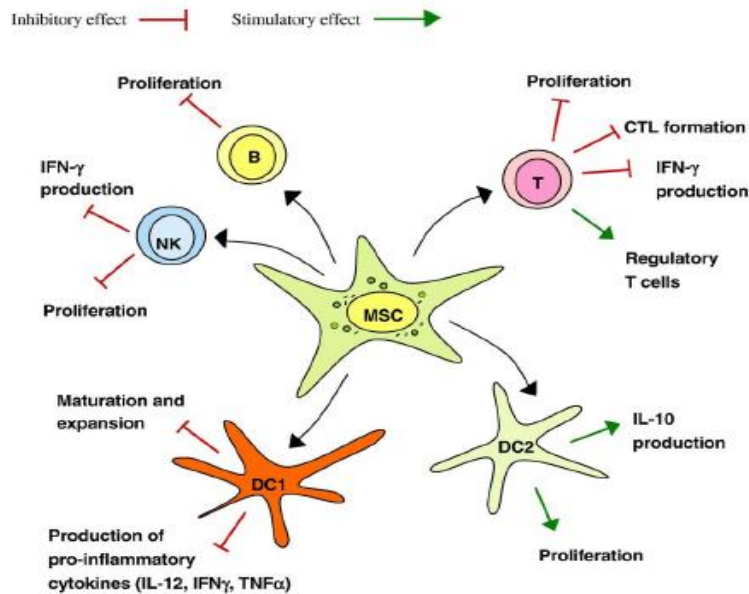


Fig. 14: Rappresentazione schematica degli effetti delle MSCs sul sistema immunitario (Franquesa et al., 2012 *Co-transplantation 2012*; 17:355-361)

Nonostante un vasto numero di studi abbia documentato l'attività immunodepressiva delle MSCs, i meccanismi sottostanti non sono ancora del tutto noti. E' probabile che nel mediare tale attività le MSCs si servano sia di contatti diretti cellula-cellula che dell'azione di mediatori solubili [320].

Oltre alle proprietà immunomodulanti, è descritta in letteratura la capacità delle MSCs di contribuire alla rigenerazione tissutale in seguito al danno tissutale a carico di diversi organi, quali cuore, fegato, cervello, pancreas e rene.

E' stato recentemente dimostrato che l'infusione di MSCs migliora la ripresa dal cosiddetto AKI (acute kidney injury). In particolare diversi studi hanno evidenziato come la somministrazione di MSCs acceleri la guarigione dal danno tubulare acuto mediato da cisplatino, glicerolo e ischemia-riperfusion. Il meccanismo sottostante rimane ad oggi non del tutto noto. In alcuni esperimenti viene descritto come le MSCs intervengano direttamente nella rigenerazione delle cellule dei nefroni danneggiati. In altri studi è invece riportato come le MSCs si ritrovino a livello degli organi trapiantati solo transitoriamente, senza che intervengano direttamente nella riparazione tissutale. Ciò suggerisce che le MSCs

agiscono attraverso dei mediatori paracrini. Tra questi spiccano le cosiddette microvescicole, di cui è stato dimostrato il cui ruolo effettivo nel favorire la rigenerazione delle cellule epiteliali tubulari e la ripresa funzionale renale dopo danno indotto da glicerolo [370]

Il primo step dell'interazione tra le MSCs e le loro cellule target necessita del contatto diretto cellula-cellula attraverso molecole di adesione, come dimostrano gli studi in cui è stato osservato che l'inibizione della proliferazione delle cellule T dalle MSCs richiede il reclutamento della molecola inibitoria pD1 da parte del suo ligando.

Diversi mediatori solubili ad attività immunosoppressiva sono stati identificati nei processi di immunoregolazione mediata dalle MSCs, alcuni prodotti costitutivamente dalle cellule, altri rilasciati in seguito al contatto con le cellule target. Esempi di quest'ultimo gruppo di mediatori sono l'ossido nitrico e IDO, che sono rilasciati dalle MSCs solo dopo lo stimolo mediato dall'IFN γ prodotto dalle cellule target [331, 332]. IDO induce la deplezione del triptofano prodotto dal microambiente locale, il quale rappresenta un aminoacido essenziale per la proliferazione linfocitaria. IDO prodotto dalle MSCs ha un ruolo nell'inibire la proliferazione dei linfociti T helper produttori di IFN γ [331] e insieme alla prostaglandina E2 (PGE2) sarebbe in grado di bloccare l'attività delle cellule NK [331, 333].

Inoltre IFN γ , da solo o in combinazione con le citochine pro-infiammatorie TNF, IL-1 α , IL-1 β stimolano la produzione da parte delle MSCs dei topi di chemochine che attraggono le cellule T e di ossido nitrico sintasi (iNOS), che inibisce l'attivazione dei linfociti T attraverso la produzione di ossido nitrico [334]. Le MSCs dei topi con deficit del recettore IFN γ R1 non hanno proprietà immunosoppressive, il che sottolinea il ruolo cruciale dell'IFN γ in questo modello [334].

Altri fattori solubili come TGF β 1, HGF, IL-10, PGE2, HO1, IL6 e HIA-G5 sono costitutivamente prodotti dalle MSCs [334, 335, 336, 337]. Inoltre la produzione di alcune di queste molecole può essere incrementata dal rilascio di citochine da parte delle cellule target dopo l'interazione con le MSCs. Per esempio TNF e

IFN γ sono in grado di incrementare costitutivamente la produzione di PGE2 da parte delle MSCs [338]. Tra questi fattori prodotti costitutivamente è stato osservato che IL-6 ritarda l'apoptosi cellulare dei neutrofili umani, inducendo la fosforilazione dei fattori di trascrizione [339] e inibendo la differenziazione dei progenitori midollari in DCs [337]. Un'altra molecola implicata nell'azione immunomodulante delle MSCs è HIA-G5. Si è osservato che la produzione del fattore solubile HIA-G5 da parte delle MSCs è in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti T, delle cellule NK e la citotossicità T-cellulo mediata nonché la produzione dei linfociti T regolatori [336]. Il contatto tra le MSCs e i linfociti T attivati induce la produzione di IL-10, che a sua volta gioca un ruolo essenziale nella stimolazione del rilascio di HIA-G5 da parte delle MSCs stesse [336]. Comunque l'inibizione di una di queste molecole non esita nella completa perdita della capacità immunodepressiva delle MSCs. E' quindi chiaro che nessuna di queste molecole ha un ruolo esclusivo e che l'immunoregolazione mediata dalle MSCs implica l'attivazione di un sistema ridondante, in cui sono coinvolte diverse molecole.

Applicazioni cliniche delle MSCs

Oltre alle proprietà immunomodulanti e immunodepressive delle MSCs e al loro potenziale ruolo nella riparazione del danno tissutale acuto bisogna anche considerare il fatto che le MSCs sono isolabili piuttosto facilmente e hanno un enorme potenziale espansivo, se poste in coltura, tutte caratteristiche che le rendono promettenti candidate per l'immunoterapia e per il trattamento di diverse patologie autoimmuni [330].

I primi studi *in vivo* eseguiti sulle MSCs sono stati focalizzati principalmente sulla loro capacità di facilitare l'attecchimento delle HSCs trapiantate [340] e di promuovere la riparazione strutturale e funzionale dei tessuti danneggiati, garantita dalle loro proprietà "stem-cells-like". L'utilizzo delle MSCs a scopi terapeutici ha peraltro il vantaggio che sono cellule scarsamente immunogene *in vitro* [342], e sono già stati eseguiti studi preclinici [343] e studi sull'uomo [344] che testimoniano il possibile utilizzo di MSCs da donatori allogenici, con buoni profili di sicurezza almeno a breve termine. In particolare sono stati eseguiti studi

sulla GVHD, sul trapianto cardiaco, in patologie autoimmuni come il LES. Nel trapianto renale si sta facendo strada il possibile ruolo delle MSCs nella terapia d'induzione, con risultati incoraggianti se pur a breve termine, sia in termini di efficacia (basso tasso di rigetto acuto) che di sicurezza [372, 373].

Meccanismi paracrini coinvolti nella comunicazione cellulare: ruolo delle microvescicole (MVs)

Sono stati descritti numerosi meccanismi coinvolti nella comunicazione cellulare, tra cui la secrezione di fattori di crescita, citochine, recettori di superficie e nucleotidi.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che le cellule possono comunicare anche attraverso il rilascio di piccoli frammenti circolari di membrana chiamati microvescicole (MVs) [351], che per molto tempo erano stati invece considerati prodotti di scarto cellulari, formati in conseguenza di danno cellulare o come esito del fisiologico turn over di membrana [352]. Solo di recente è stato definito il ruolo delle microvescicole/esosomi rilasciati nel microambiente da parte di vari tipi cellulari. Le MVs possono essere rilasciate attraverso due principali meccanismi: possono originare dal compartimento endosomale ed essere rilasciate dalla superficie cellulare dopo fusione con la membrana plasmatica [352]; oppure possono “germogliare” direttamente dalla superficie della membrana cellulare (attraverso il meccanismo di shedding) [353]. La popolazione di vescicole che si ritrova nelle colture *in vitro* ed *in vivo* nei fluidi biologici è un mix di esosomi e di *shedding vesicles*, che nell'insieme prendono il nome di microvescicole.

Dopo il loro rilascio le MVs possono rimanere nello spazio extracellulare in prossimità del loro sito di origine oppure possono entrare nei fluidi biologici, raggiungendo siti anche lontani (sono state trovate in diversi fluidi come il plasma, le urine, il latte, il liquido cerebro-spinale). Le MVs sono una popolazione cellulare variegata, che si diversifica per il sito d'origine, il numero, la dimensione e la composizione antigenica [354], che vengono rilasciate da diversi tipi cellulari in condizioni sia fisiologiche che patologiche.

La formazione delle MVs

Il rilascio di MVs può essere costitutivo o conseguente all'attivazione cellulare da parte di agonisti solubili, di stress fisici o chimici, come lo stress ossidativo e l'ipossia, e allo shear stress.

Gli esosomi: hanno origine endosomiale e sono una popolazione piuttosto eterogenea di particelle di diametro variabile tra 30 e 120 nm [352]. Vengono immagazzinati all'interno delle cellule sotto forma di corpi multivescicolati a livello degli endosomi e il loro rilascio avviene per fusione con la membrana cellulare (Fig 15a), attraverso un meccanismo di esocitosi dipendente dal citoscheletro e regolato dalla proteina p53.

Le shedding vescicles: sono solitamente più grandi degli esosomi con dimensioni variabili tra i 100 nm e 1 µm. Originano in seguito alla formazione di protrusioni citoplasmatiche con successivo distacco dalla superficie cellulare (Fig 15b), con un meccanismo calcio-dipendente mediato da processi di riorganizzazione del citoscheletro. I due meccanismi coinvolti nella formazione delle MVs sono legati a redistribuzione dei componenti fosfolipidici della membrana cellulare mediati da enzimi chiamati flippasi, flambasi, scramblasi [356]. In breve l'incremento della concentrazione intracellulare di calcio inibisce la traslocazione e induce l'attivazione della scramblasi che trasloca la fosfatidilserina dalla parte interna alla parte esterna della membrana cellulare. Le MVs esprimono sulla loro superficie grandi quantità di fosfatidilserina e sono arricchite delle proteine associate ai fosfolipidi di membrana.

A seconda del tipo di cellula di origine e del meccanismo di formazione le MVs hanno dimensioni e composizione molecolare differente.

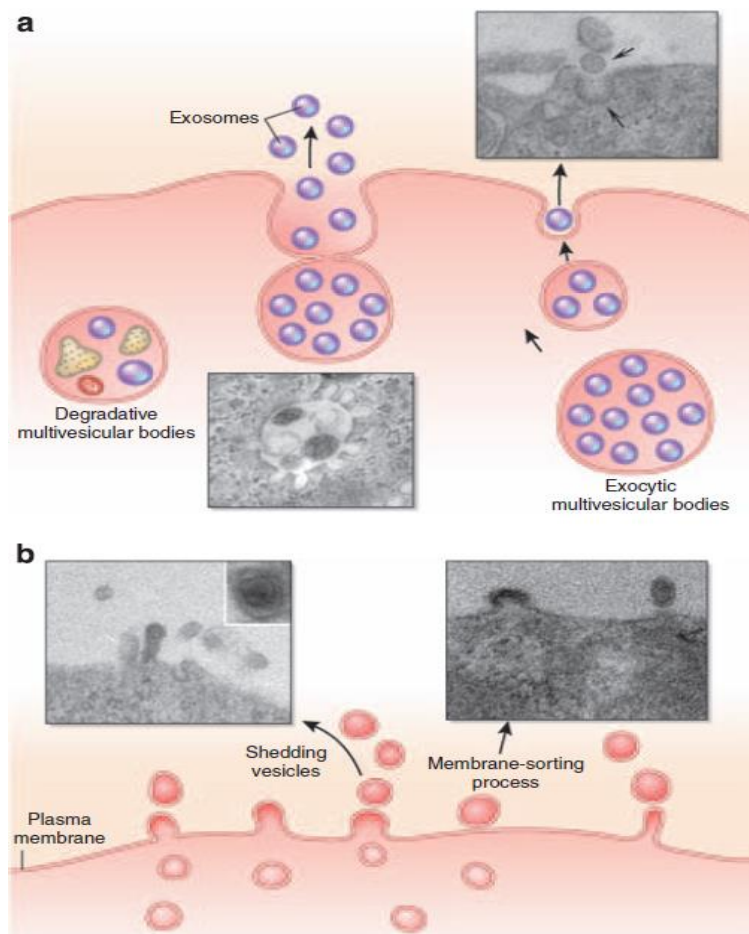


Fig. 15: Rappresentazione schematica della formazione degli esosomi (a) e delle shedding vesicles (b) (Camussi G et al, *Kidney International* 2010: 78: 838-848)

L'attività biologica della MV

Attualmente le MVs sono considerate dei componenti importanti del microambiente intercellulare e giocano un ruolo chiave nella comunicazione cellula-cellula.

E' stato osservato in differenti studi che le MVs rilasciate da determinati tipi cellulari interagiscono con altre cellule mediante specifici recettori, inducendo l'attivazione cellulare o direttamente o attraverso il trasferimento di recettori di superficie [363, 364]. questo è indice che le MVs interagiscono solo con determinate cellule target piuttosto che con qualunque cellula del microambiente [365]. L'interazione avviene attraverso un legame cellula-cellula, recettore-mediato, grazie a cui avviene la comunicazione intercellulare [353]. Durante il

processo di internalizzazione, dopo la fusione con la membrana, le MVs sono in grado di rilasciare il loro contenuto attraverso trasferimento orizzontale nel citosol delle cellule target. In alternativa è possibile che le MVs rimangano segregate negli endosomi e siano trasferite ai lisosomi o espulse dalle cellule dopo il processo di fusione con la membrana, dando vita al cosiddetto processo di transitosi [353]. Il comportamento delle cellule target può essere variabilmente influenzato dalle MVs e le MVs possono influenzare il comportamento delle cellule target in vario modo (Fig. 16).

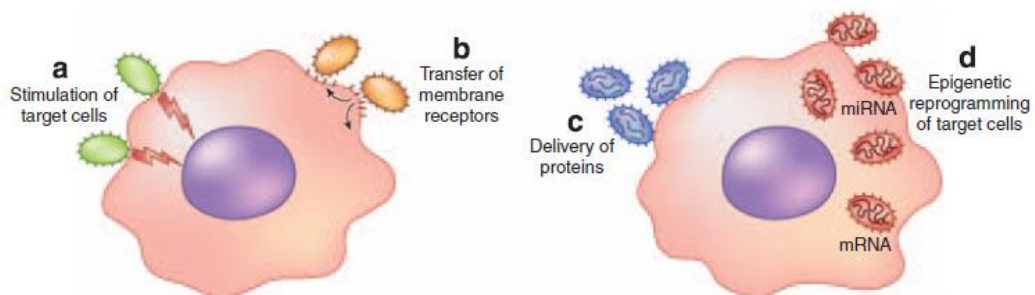


Fig. 16: Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella comunicazione cellula-cellula mediate dalle MV; (a) stimolazione diretta; (b) trasferimento di recettori; (c) trasferimento di proteine; (d) trasferimento di mRNA/miRNA (Camussi G et al, *Kidney International* 2010: 78: 838-848)

Le MVs, sotto forma di complessi-segnale, possono stimolare direttamente l'attivazione delle cellule target (ad es. le MVs implicate nella cascata della coagulazione che derivano dalle piastrine) [351]. Possono anche agire trasferendo tra le varie cellule dei recettori (ad es. il trasferimento di recettori antigenici dai linfociti B o il trasferimento del CD41 dalle piastrine alle cellule endoteliali). Inoltre sono in grado di trasferire da una cellula all'altra del materiale proteico (ad es. i monociti inducono la morte delle cellule del muscolo liscio attraverso il rilascio di MVs contenenti la caspasi-1). Le MVs possono mediare trasferimento orizzontale di materiale genetico. Questo processo di trasferimento è molto interessante e può spiegare diversi fenomeni quali ad esempio le modifiche epigenetiche che spesso sono riportate nelle co-culture. E' stato osservato che le

MVs che originano da cellule tumorali possono trasferire non solo antigeni di superficie, ma anche mRNA delle cellule tumorali stesse ai monociti [362]. Inoltre Ratajczak et al. [363] hanno dimostrato che le MVs originanti da cellule staminali embrionali murine possono indurre una riprogrammazione epigenetica a carico delle cellule target favorendo l'*up-regulation* di markers tipici delle cellule pluripotenti e delle cellule staminali ematopoietiche (ECS), non solo ma anche inducendo la fosforilazione delle protein-kinasi p42/44 e AKt. Inoltre le MVs derivanti dalle ECS esprimono l'mRNA di numerosi fattori di trascrizione che possono essere trasferiti alle cellule target e tradotti nelle corrispondenti proteine. Il trattamento delle MVs con l'RNase inibisce la loro azione, a testimonianza del fatto che il ruolo dell'mRNA è centrale nella mediazione degli effetti delle MVs. Il nostro gruppo ha inoltre dimostrato che le MVs che originano dai progenitori endoteliali umani (EPCs) possono agire proprio come veicolo nel trasporto di mRNA tra le cellule [363]. Le MVs delle EPCs sono internalizzate nelle cellule endoteliali attraverso l'interazione con le integrine $\alpha 4$ e $\beta 1$ espresse sulla loro superficie e attivano un programma angiogenetico. Attraverso l'analisi RT-PCR è stato possibile rilevare che le MVs veicolano uno specifico subset di mRNA cellulare, che include gli mRNA implicati nel *pathway* dell'angiogenesi come le vie di segnalazione di PI3K/AKT ed eNOS. Dopo l'incorporazione delle MVs a livello intracellulare si ha un'*up-regulation* delle proteine fosfatidilinositolo 3-kinasi e dell'ossido nitrico sintasi. Yuan et al. hanno recentemente dimostrato che le MVs insieme all'mRNA trasferiscono anche dei microRNA [365]. Il nostro gruppo ha dimostrato che anche le MVs delle EPCs contengono microRNA, in particolare contengono miR-126, miR-296, che sono due microRNA con azione pro-angiogenetica coinvolte nei *pathways* di VEGF, EGF ed FGF. Dato che i microRNA sono regolatori fisiologici della traslazione proteica, il fatto che i microRNA possano essere trasferiti tra cellula e cellula attraverso le MVs indica che le cellule staminali, ma anche cellule mature possano alterare l'espressione genica di altre cellule attraverso questo meccanismo [366].

Parte seconda

SCOPO DELLO STUDIO

La recente individuazione e caratterizzazione dei linfociti T e B regolatori ha aperto interessanti prospettive ed opportunità per quanto riguarda la comprensione e l'induzione della tolleranza immunologica, l'immunoterapia e l'immunomodulazione nel trapianto d'organo.

Nonostante i molteplici studi effettuati, in particolare sui linfociti T regolatori, rimangono ancora limitate le conoscenze legate ai meccanismi di reclutamento e stimolazione di questa popolazione linfocitaria.

In questo contesto tale studio si propone come obiettivo primario quello di mettere a punto metodi di isolamento ed espansione dei T_{REG} in vitro/ex vivo, articolandosi in due sezioni.

PARTE PRIMA

Nella prima parte dello studio verrà indagato il ruolo della trombospondina-1 come mediatore molecolare di tolleranza immunologica.

Da tempo è nota in letteratura la capacità degli mTORi di esercitare un'azione differenziale sulle varie classi linfocitarie. In particolare sembrerebbero inibire le classi flogogene come i T helper (Th) e favorire le classi T regolatorie (T_{REG}).

Alcuni autori hanno invece proposto che gli mTORi possano favorire l'espansione delle classi T memoria (T_{MEM}) e quindi essere deleteri per i tessuti trapiantati favorendo il rigetto cronico.

Recentemente si è dimostrato che anche all'interno della popolazione linfocitaria di tipo B esiste una sottoclasse tollerogena (B_{REG}) caratterizzata dall'espressione della proteina TIM-1. L'effetto della terapia immunosoppressiva trapianto-associata sulle sottopopolazioni linfocitarie B non è ancora noto.

In questo contesto si inserisce la necessità di approfondire le conoscenze riguardanti il coinvolgimento della trombospondina-1 (TSP-1) nei meccanismi di tolleranza immunitaria. Molteplici studi hanno dimostrato un aumento della produzione linfocitaria di trombospondina a seguito della stimolazione con mTORi mentre dati preliminari ne dimostrerebbero l'aumento anche a livello tissutale.

Tra le molteplici azioni della trombospondina vi sarebbe anche l'induzione della classe T_{REG}. Non è noto se le classi B_{REG} siano responsive a tale molecola.

Sebbene vari studi abbiano analizzato l'effetto farmacologico della terapia immunodepressiva su singole popolazioni linfocitarie, non vi sono al momento lavori che abbiano proposto uno sguardo d'insieme rivolto contemporaneamente alle numerose sottoclassi T e B.

Nella prima parte dello studio quindi verranno indagati:

1. La relazione tra mTORi e T_{REG}/B_{REG}.
2. La relazione tra TSP-1 e T_{REG}/B_{REG}.
3. L'interazione tra TSP-1 ed mTORi.
4. La presenza o assenza di un effetto diretto degli mTORi sulle popolazioni T e B memoria.
5. Quali siano le sedi di produzione e rilascio della TSP-1 ed in particolare il ruolo delle cellule tubulari ed endoteliali peritubulari renali in tal senso.

PARTE SECONDA

La medicina rigenerativa basata sull'impiego di cellule staminali rappresenta una nuova frontiera terapeutica. In particolare il ruolo delle cellule staminali nella riparazione del danno tissutale è stato messo in evidenza da numerosi studi, rendendo sempre più concreta l'ipotesi di utilizzarle nel prossimo futuro quale terapia di differenti patologie, facendosi strada la possibilità di un possibile utilizzo anche nella medicina dei trapianti.

E' noto che le cellule progenitrici endoteliali (EPCs) promuovono l'angiogenesi e la riparazione tissutale mentre le cellule staminali mesenchimali (MSCs) hanno capacità di indurre effetti rigenerativi ed immunomodulanti. Entrambi questi tipi cellulari rilasciano mediatori paracrini, tra cui le microvescicole (MVs), piccole particelle che favoriscono la comunicazione intercellulare attraverso il trasferimento di proteine e RNAs. Le MVs contengono microRNA (miRNAs), piccoli RNAs non codificanti in grado di modulare la trasduzione delle proteine.

Nella seconda parte dello studio ci si è concentrati sulla valutazione del ruolo delle cellule staminali mesenchimali nell'attivazione dei linfociti T regolatori e

nella modulazione delle loro funzioni anche attraverso mediatori solubili, quali TSP-1 e MVs.

In particolare ci si è posti come obiettivo:

1. L'isolamento e la caratterizzazione delle MVs originanti dalle MSCs per valutare le loro proprietà di immunomodulazione nel rigetto T cellulo-mediato dopo il trapianto di rene. In particolare abbiamo valutato la capacità delle MVs di trasferire materiale genetico coinvolto nei meccanismi di immuno-tolleranza.

Parte terza

MATERIALI E METODI

PARTE PRIMA

Descrizione della popolazione selezionata

Sono stati inclusi nello studio pazienti trapiantati di rene presso l'A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino (presidio San Giovanni Battista "Molinette"), portatori di trapianto tutt'ora funzionante, per un totale di 48 pazienti. I pazienti selezionati sono stati sottoposti a trapianto di rene in un periodo compreso tra il 1994 e il 2012.

Sono stati esclusi tutti i pazienti deceduti e rientrati in dialisi, i pazienti sottoposti a trapianto combinato e con anamnesi neoplastica e i pazienti con valore di creatinina ematica superiore a 3 mg/dL al momento del campionamento.

Sono stati esaminati quindi 3 gruppi di pazienti suddivisi sulla base del trattamento immunosoppressivo assunto: 1) Gruppo Rapamicina (RAPA): pazienti in terapia con rapamicina in associazione o meno a tacrolimus e/o steroidi; 2) Gruppo Everolimus (EVE): pazienti in terapia con everolimus in associazione o meno a tacrolimus e/o steroidi; 3) Gruppo inibitori delle calcineurine (CNI): gruppo "di controllo" in terapia con tacrolimus o ciclosporina in associazione o meno a steroidi

Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti appartenenti ai tre gruppi che hanno effettuato una visita di controllo, di routine o volontaria, presso l'Ambulatorio Post-trapianto renale nel periodo compreso tra 01/01/2013 e 31/07/2013.

La numerosità del primo gruppo è risultata essere di 17 pazienti, la numerosità del secondo di 13 pazienti e quella del terzo di 18 pazienti.

Raccolta dei dati relativi alla popolazione selezionata

Per ciascuna sottopopolazione sono state indagate le seguenti variabili:

a) Il record "anagrafico e anamnestico" del ricevente:

- sesso
- età
- nefropatia di base
- valori di PRA attuali e storici

b) Il record "trapianto":

-
- data
 - numero: primo/già trapiantato in precedenza
 - presenza di DGF (delayed graft function)
- c) Il record “follow up”:
- creatininemia
 - clearance della creatinina
 - proteinuria delle 24 ore
 - numero di rigetti acuti
- d) Il record “popolazioni linfocitarie”
- percentuale T regolatori
 - percentuale T memoria
 - percentuale B regolatori
 - percentuale B memoria
- e) Il record “trombospondina-1”
- valore di TSP-1 ematica

I valori di creatinina sierica, clearance della creatinina sierica e proteinuria si riferiscono alla data dell'ultimo *follow-up* effettuato presso l'Ambulatorio Post-trapianto renale dell' I'A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino, presidio San Giovanni Battista “Molinette”.

I dati relativi ai pazienti presi in esame sono stati raccolti utilizzando come fonti principali le cartelle dell'Ambulatorio Post-trapianto renale presso cui tutti i pazienti trapiantati sono seguiti e le lettere di dimissioni del Centro Trapianti Renali “A. Vercellone”, A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino (sia al momento del trapianto sia dei ricoveri intercorrenti). Un ulteriore fonte di dati considerata è stato l'archivio informatico del CNT (Centro Nazionale Trapianti). Per l'archiviazione e la catalogazione dei dati ci si è serviti di un foglio di lavoro Microsoft AccessTm.

Campionamento e misurazione delle popolazioni linfocitarie e della TSP-1

I prelievi ematici sono stati effettuati in tutti i pazienti selezionati durante gli esami di *routine* associati al *follow-up* ordinario e non. Agli stessi pazienti e con la stessa tempistica è stato inoltre richiesto un campione urinario a fresco.

Per tutti i prelievi ematici sono state effettuate, tramite citofluorimetria a flusso, le misurazioni quantitative delle sottopopolazioni linfocitarie T_{REG}, T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM}.

Sono state inoltre indagate la presenza nonché la concentrazione della TSP-1 ematica, tramite saggio ELISA.

Analisi citofluorimetrica

Le analisi mediante citofluorimetria a flusso sono state condotte in tre differenti *setting* sperimentali:

1. Sul sangue periferico dei pazienti inclusi nello studio, per la quantizzazione e la caratterizzazione fenotipica delle seguenti popolazioni: T_{REG}, T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM}.
2. Su PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) estratti da *buffy coat* destinati a scopo di ricerca al fine di valutare la percentuale di espressione di T_{REG}, T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM}.
3. Su linfociti T e B isolati dai PBMC per la valutazione della produzione di TSP-1 in condizioni basali e sotto lo stimolo di differenti farmaci.
4. Su cellule tubulari renali (TEC) ed endoteliali peritubulari renali (PEC) allo scopo di identificare la percentuale di espressione della TSP-1.

Al fine di quantificare l'espressione degli antigeni di superficie e della TSP-1, sono stati utilizzati anticorpi monoclonali (mAbs) coniugati con fluorocromi FITC, PE o PercP diretti contro CD4, CD25, CD19, CD45RO, CD27 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), TIM-1 (R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA), Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD47 [B6H12.2] (GeneTex Irvine, CA, USA) e TSP Ab3 (C6.7) (NeoMarkers, Fremont, CA, USA).

Come controllo sono state utilizzate IgG murine o di ratto non immuni FITC o PE (Dako, Denmark A/S).

Per i tre *setting* sperimentali descritti sono stati seguiti i seguenti metodi per la marcatura degli antigeni di superficie delle diverse linee cellulari:

- a) Per le marcature dirette l'analisi è stata eseguita (entro 2 h dalla raccolta del campione) su sangue intero per quanto riguarda gli esperimenti sui pazienti e su PBMC per gli esperimenti condotti *in vitro*.

100 µl di sangue intero o di PBMC risospesi in PBS (phosphate-buffered saline) sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con: 10 µl di anti-CD19, -CD27, -CD45R0, -CD25; 5 µl di anti-CD4; 5 µl di anti-TIM-1 e anti-mouse IgG2B; 1 µl di anti-mouse IgG1 PE, anti-mouse IgG1 FITC, anti-mouse IgG2a PercP e anti-mouse IgG2a FITC.

Nel caso degli esperimenti eseguiti su sangue intero, la lisi dei globuli rossi è stata ottenuta mediante aggiunta di *Ammonium chloride lysing solution*, incubato con i campioni per 20 minuti.

Le cellule sono state quindi lavate e risospese in PBS per la lettura del campione.

- b) Per la marcatura intracellulare utilizzata per il rilevamento del fattore di trascrizione Foxp3, sono stati impiegati i buffer e gli mAbs contenuti nel kit per la marcatura del Foxp3 (PCH101, eBioscience, San Diego, CA, USA).

- c) Per la marcatura indiretta, utilizzata per la valutazione della percentuale di espressione della TSP-1, le analisi FACS sono state eseguite sia su linfociti T e B che sulle TEC.

Le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura, quindi fissate con PFA al 4% per 10 minuti a 4°C. Successivamente i campioni sono stati incubati con un mAb primario diretto contro la TSP-1, diluito 1:50 in una soluzione permeabilizzante contenente saponina. I campioni sono quindi stati incubati per 20 minuti al buio a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi lavate con PBS e incubate per 20 minuti al buio a temperatura

ambiente, con un mAb secondario diluito 1:100 in una soluzione permeabilizzante contenente saponina.

L'acquisizione è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro a flusso FACScan, i dati sono quindi stati analizzati mediante *software* cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Un minimo di 80000 eventi sono stati acquisiti e analizzati per ogni campione.

Analisi FACS sul sangue periferico dei pazienti

La caratterizzazione fenotipica della popolazione T_{REG} è stata eseguita su PBMC isolati da sangue intero mediante marcatura con mAbs anti-CD4 (2 µl) e anti-CD25 (10 µl), le cellule sono state fissate, permeabilizzate e infine marcate con anticorpi anti-Foxp3.

La popolazione T regolatoria è stata quantificata in relazione alla popolazione linfocitaria totale. Lo studio delle caratteristiche peculiari è stato poi effettuato sulla frazione di linfociti CD4 esprimenti il recettore CD25 ad elevata intensità, in linea con i dati della letteratura che hanno mostrato come la popolazione CD25^{high} sia quella che possiede la maggiore attività soppressiva.

La caratterizzazione fenotipica delle popolazioni T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM} è stata invece eseguita mediante marcatura diretta sul sangue intero.

Analisi FACS su PBMC coltivati in vitro

In tale contesto la percentuale di espressione delle popolazioni T e B regolatrici/T e B memoria è stata valutata su linfociti T e B isolati dal sangue periferico di donatori sani. L'analisi è stata eseguita in condizioni basali ed in seguito a stimolazione con rapamicina (20 ng/ml), everolimus (20 ng/ml) e tacrolimus (20 ng/ml), comprati dalla ditta Sigma-Aldrich. Tutte le popolazioni sono state quindi espresse in relazione al totale delle cellule mononucleari periferiche.

Isolamento di linfociti T e B

I linfociti T e B sono stati isolati a partire da PBMC, estratti mediante centrifugazione su gradiente di densità (Histopaque 1077; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), dal sangue periferico di donatori volontari sani. Successivamente, i linfociti sono stati purificati sulla base dell'espressione del CD3 nel caso dei T e

del CD19 nel caso dei B, mediante *sorting* immunomagnetico (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA).

I linfociti così ottenuti, sono poi stati coltivati in medium RPMI contenente 10% di FBS.

Analisi Real-Time qPCR

L'analisi real-time PCR quantitativa è stata effettuata sull'RNA estratto dalle cellule T e B al fine di dimostrare la capacità delle stesse cellule di sintetizzare TSP-1.

Il primo filamento di cDNA è stato ottenuto dall'RNA totale mediante il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per ogni cDNA sono stati usati tra 200 e 400 ng di mRNA, 2 µl di buffer RT, 0,8 µl di dNTP, 2 µl di random primer RT, 1 µl di trascrittasi inversa MultiScribe e 4,2 µl di acqua priva di nucleasi.

Il cDNA è stato successivamente conservato a -20°C.

Infine 20 µl della mix per la RT-PCR, contenente 1X SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM di ogni primer, 0,1 µl, e 2 µl del cDNA delle cellule T e B è stata inserita nella piastra a 48 pozzetti StepOne Real Time System (Applied Biosystems). Come controllo negativo è stata utilizzata una mix senza cDNA ed è stata caricata in parallelo ad ogni campione.

Saggio ELISA

Il plasma dei pazienti arruolati nello studio e il surnatante di TEC, stimulate con rapamicina (20 ng/mL), everolimus (20 ng/mL) e tacrolimus (20 ng/mL), sono stati sottoposti a test ELISA (Human Quantikine ELISA, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA), per la valutazione della concentrazione di TSP-1.

Diluizioni seriali di TSP-1 ricombinante umana (concentrazione dello stock 1000 ng/mL) in Calibrator Diluent RD5-33 (R&D systems), sono state utilizzate per costruire una curva standard di calibrazione con estremi tra 0 ng/mL e 500 ng/mL. L'assorbanza è stata rilevata alla lunghezza d'onda di 450 nm mediante spettrofotometro Smart Spec 3000 microplate reader (Bio Rad, Hercules, CA).

Coltura e isolamento di cellule tubulari epiteliali umane (TEC)

Colture primarie di cellule epiteliali tubulari sono state ottenute da reni rimossi attraverso procedure chirurgiche in pazienti affetti da carcinoma renale. Una linea

immortalizzata di epitelio tubulare (TEC) è stata generata attraverso l'infezione con un virus ibrido Adeno5/SV40; tale linea è stata utilizzata in tutte le procedure sperimentali eseguite nell'ambito di questo studio. Tale linea cellulare è stata coltivata in terreno RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) contenente 10% siero di bovino fetale (FCS) (Hyclone, Logan, Utah) e 2mM glutamina (GIBCO). La purezza della coltura di TEC è stata valutata attraverso la caratterizzazione cellulare.

È stata dimostrata l'assenza di marcatura per il fattore di von Willebrand, una marcatura di lieve entità per le proteine dei filamenti intermedi (desmina e vimentina) e una marcatura positiva per le citocheratine e l'actina. È stata inoltre rilevata positività per *marker* caratteristici delle cellule epiteliali pienamente differenziate del tubulo renale, come la fosfatasi alcalina, l'aminopeptidasi A, la megalina, lo ZO-1, il cotrasportatore sodio/potassio/cloro (NKCC) e la proteina di Tamm Horsfall (THP). In base a tale caratterizzazione è possibile dedurre che le TEC così ottenute costituiscono una coltura mista del tubulo prossimale e distale. Le TEC hanno mostrato un'aumentata produzione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) in seguito a stimolazione con ormone paratiroideo alla concentrazione 100 nM.

Coltura di cellule endoteliali peritubulari (PEC)

Colture di cellule endoteliali peritubulari (PEC) sono state ottenute da reni rimossi attraverso procedure chirurgiche in pazienti affetti da carcinoma renale. La componente tubulare è stata isolata mediante passaggio attraverso filtri di diversa dimensione. La sospensione cellulare è stata quindi incubata con biglie magnetiche rivolte contro l'antigene endoteliale CD31 e selezionate positivamente mediante sorting immunomagnetico (Milteny Biotech, Auburn, CA, USA). Le cellule endoteliali così purificate, sono state dunque coltivate in terreno EBM2 (PBI, International, Milano, Italia) contenente 10% siero fetale bovino (FBS) (Hyclone, Logan, Utah) e 2mM glutamina (GIBCO).

La purezza delle colture di cellule endoteliali peritubulari è stata valutata attraverso la caratterizzazione cellulare: è stata osservata una marcatura positiva per il fattore di von Willebrand, per gli antigeni di membrana CD31 e CD105 e

per la vimentina, una marcatura negativa è stata invece rilevata per la citocheratina e la desmina.

Adesione dei PBMC sulle cellule TEC e sulle PEC

I PBMC sono stati isolati a partire dal sangue periferico di donatori volontari sani mediante centrifugazione su gradiente di densità (Histopaque 1077; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Successivamente sono stati marcati con 10 µl di colorante Vybrant cell (Invitrogen). Per testare l'adesione sulle TEC, 50×10^6 /ml PBMC sono stati incubati, per 72 h, su un *monolayer* di cellule confluenti stimulate con citochine infiammatorie (INF γ , TNF α , granzima A e FAS Ligand) in presenza o meno di 50 ng/mL di TSP ricombinante umana (rHTHBS1, Raybiotech).

Tutti i campioni sono stati fissati con paraformaldeide all'1% e osservati con un microscopio a luce UV. I PBMC sono stati quindi contati in 10 differenti campi ad un ingrandimento di 200x.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta in più fasi. Si è inizialmente proceduto alla descrizione dei campioni selezionati e all'analisi dei dati presi in considerazione. Successivamente le due sottopopolazioni in trattamento con m-TOR inibitori sono state paragonate, per ogni variabile indagata, al gruppo di controllo in terapia con CNI, al fine di valutare la presenza di differenze statisticamente significative tra i 3 gruppi.

Si è quindi indagato il ruolo degli m-TOR inibitori e della TSP-1 nell'induzione delle popolazioni linfocitarie con fenotipo regolatore.

Infine è stata analizzata la correlazione tra m-TOR inibitori e secrezione della TSP-1 da parte dei linfociti T e B regolatori e di cellule tubulari renali.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con SPSS (SPSS Inc. Chicago IL, vers. 12.02). Le variabili continue, nel caso di distribuzioni non normali, sono state descritte con la mediana (minimo-massimo) e la differenza tra gruppi è stata verificata con test non parametrici (Mann-Whitney).

Le distribuzioni normali sono state descritte con la media \pm deviazione standard e la differenza tra gruppi è stata verificata con test t di Student o ANOVA.

Le variabili categoriche sono state descritte con frazioni e la differenza di incidenza è stata verificata con test Chi-Square (Pearson) o, nel caso di fosse reso necessario, con il test esatto di Fisher. Quando opportuno è stato calcolato l'odds ratio quale stima di Rischio Relativo.

Il livello di significatività (α) è stato fissato, per tutti i test, a 0,05.

PARTE SECONDA

Isolamento e caratterizzazione delle MSCs umane

Il consiglio di revisione del Centro di Biotecnologia Molecolare ha dato l'approvazione allo studio.

Sono state prelevate le cellule del midollo spinale da 13 volontari sani a cui è stato chiesto il consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

Le cellule del midollo osseo sono state stratificate su un gradiente Ficoll (densità 1022 g/mL; Sigma-Aldrich) e centrifugate a 1500 rpm per 30 minuti. Le cellule mononucleate sono state poste in coltura su terreni contenenti cellule staminali mesenchimali (MSCBM, Lonza). Dopo 5 giorni il terreno di coltura è stato modificato. Per consentire l'espansione delle cellule isolate, è stato eseguito trattamento con la tripsina per 5 minuti a 37°C dopo 15 giorni dal primo passaggio e poi ogni 7 giorni per i passaggi successivi. Le cellule sono state seminate alle densità di 10000 cellule/cm² e utilizzate entro il sesto passaggio. Le MCSs sono state caratterizzate per l'espressione di antigeni di superficie: non esprimono marcatori ematopoietici quali CD45, CD14 e CD34 né molecole di costimolazione (CD 80, CD86 e CD40) né markers endoteliali (CD31, fattore di Von Willebrand, KDR). Mentre tutte le cellule nei vari passaggi colturali esprimono i markers tipici delle MSC: CD105, CD73, CD44, CD90, CD166 e CD146; esprimono inoltre HLA di classe I.

Isolamento delle MVs dalle MCSs

Le MVs sono state ottenute dal supernatante delle MSCs poste in coltura in RPMI, private del FCS e supplementate con 0.5% di BSA (Sigma). La viabilità delle cellule incubate per una notte senza siero è risultata del 99%. Nessuna

cellula apoptotica è stata rilevata mediante analisi TUNEL. Dopo tre centrifugazioni a 3300 g per 10 minuti per rimuovere eventuali detriti, il supernatante privo di cellule è stato filtrato con un filtro da 0.22 µm, ultracentrifugato a 200000 g (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L-90K) per un'ora a 4°C, lavato in PBS e sottoposto a una seconda ultracentrifugazione nelle stesse condizioni. Per poter rilevare le MVs *in vivo* ed *in vitro*, mediante analisi con microscopio a fluorescenza o con FACS, le MVs sono state marcate con il cromoforo alifatico fluorescente rosso intercalato nella tintura PKH26 (Sigma). Dopo la marcatura le MVs sono state lavate ed ultracentrifugate a 100000 g per 1 ora e 4°C. I pellet di MVs sono stati sospesi in terreno di coltura 199 ed il contenuto proteico è stato quantificato mediante metodo Bradford (BioRad).

In determinati esperimenti le MVs sono state trattate con 1 U/mL di RNase (Ambion Inc) per 1 ora a 37°C; la reazione è stata interrotta dall'aggiunta di 10 U/mL di inibitore dell'RNase (Ambion Inc) e le MVs sono state lavate mediante ultracentrifugazione. L'efficacia del trattamento con RNase è stata testata mediante analisi MV-RNA con bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent). Inoltre l'RNA estratto sia dalle MVs trattate con RNase che da quelle non trattate è stato marcato e analizzato su gel di Agarosio allo 0.6% mostrando la completa degradazione dell'RNA da parte dell'RNase.

Caratterizzazione delle MSCs e delle MSC-MVs

Estrazione dell'RNA e analisi con Bioanalyzer

Per estrarre l'RNA dalle MSCs e dalle MVs da esse derivanti è stato utilizzato il kit Mirvana (Ambion). Le MSCs e le MVs sono state lisate e l'RNA è stato estratto mediante fenol-cloroformio ed etanolo e poste in colonne con soluzione priva di RNase. L'analisi dell'RNA contenuto nelle MSC è stata effettuata mediante Bionalyzer (Agilent Tech) usando il kit RNA 6000 Nano LabChip. 5 µg di RNA è stato sottoposto a gradiente elettroforetico.

Real Time PCR quantitativa

L'analisi RT-PCR quantitativa è stata eseguita su tutti gli RNA estratti dalle MSCs e dalle MVs per confermare la presenza di Foxp3, TSP e TIM-1. Il cDNA delle MSCs e delle MVs è stato utilizzato per testare l'efficacia dei primers. Per la sintesi di ciascun cDNA sono stati utilizzati da 200 a 400 ng di mRNA, 2 µL di RT buffer, 0.8 µL di RT random primers, 1 µL di trascrittasi inversa MultiScribe e 4.2 µL di acqua priva di nucleasi. Dopo la trascrizione inversa il cDNA è stato stoccato a -20°C. 20 µL di miscela RT-PCR, contenente 1X SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM di ciascun primer e 0 µL, 1 µL e 2 µL di cDNA delle MSCs, è stata composta utilizzando il 48-well StepOne Real Time System (Applied Biosystems). I controlli privi di cDNA sono stati analizzati in parallelo.

Analisi FACS

L'analisi FACS (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) è stata utilizzata per indagare la presenza di Foxp3, TSP-1 e TIM-1 nelle MSCs e nelle MVs. Dopo risciacquo dello strumento con un'apposita soluzione, si è proceduto all'analisi mediante citofluorimetro usando i seguenti anticorpi PE- o FITC- associati diretti contro: Foxp3 (eBioscience), TSP-1 (NeoMarkers, Fremont, CA) e TIM-1 (R&D Systems); come controllo sono state usate delle FITC o PE IgG isotipiche di topo (Dako Cytomation Copenhagen, Denmark). In particolare le MSCs e le MVs sono state incubate con ciascun anticorpo o isotipo PE o FITC di controllo per un'ora a 4°C in PBS 0.25% BSA (Acros Organics, Geel, Belgium), Sodium Azide 0.02% (Sigma-Aldrich) e poi analizzate con il FACS.

Isolamento dei linfociti B

I linfociti B sono stati isolati dalla milza di donatori a cuore non battente. Le cellule spleniche sono state centrifugate e i linfociti B sono stati purificati dai PBMCs utilizzando un anticorpo anti-CD19 mediante il sistema MACS (Miltenyi Biotec.).

Isolamento dei linfociti T

Le PBMCs dei riceventi di trapianto renale sono state ottenute mediante centrifugazione con gradiente di densità. Poi i linfociti T sono stati purificati dalle

PBMCs utilizzando un anticorpo anti-CD3 mediante il sistema MACS (Miltenyi Biotec.).

Internalizzazione delle MV

I linfociti T e B sono stati incubati per 6 ore con 10, 50 e 100 µg/mL di MVs originanti dalle MSCs pre-marcate con il cromoforo alifatico fluorescente rosso intercalato nella tintura PKH26 (Sigma). L'internalizzazione delle MVs è stata poi testata mediante analisi FACS.

Transfer dell'mRNA di Foxp3 e TSP-1 dalle MVs di MSCs ai linfociti T

Per valutare la capacità delle MSCs MVs di trasferire mRNA di Foxp3 e TSP-1 nelle cellule T, queste ultime sono state isolate dai PBMCs di riceventi di trapianto renale e incubate per 24 ore con le MVs. Il trasferimento di mRNA è stato testato mediante analisi FACS e RT-PCR.

Co-culture di linfociti T e B

I linfociti T e B sono stati messi in coltura (ratio 10:1) in due condizioni sperimentali: 1) in presenza o assenza di 50 µg/mL di MVs pre-trattate o non pre-trattate con 1 U/mL di RNase; 2) in presenza di linfociti T regolatori, indotti dalle MVs, per 72 ore in RPMI senza siero in presenza di 10 mM di Brdu (Roche Diagnostics). Dopo incubazione i linfociti sono stati lavati e fissati, trattati con la nucleasi per digerire il DNA cellulare e poi incubate con anticorpi anti-Brdu-POD. Infine è stato aggiunto ABTS, di cui l'enzima perossidasi ha favorito il clivaggio, rendendo possibile la valutazione indiretta della quantità di BrdU integrata nel DNA.

Analisi statistica

I risultati di tutti gli esperimenti sono espressi in termini di media \pm SD. L'analisi statistica è stata eseguita mediante *t*-test di Student o test ANOVA con i test di Newmann-Keuls o di Dunnet, quando indicati.

Parte quarta
RISULTATI

PARTE PRIMA

Profilo clinico delle popolazioni in studio

Lo studio è stato condotto su tre popolazioni: un gruppo di pazienti in terapia con rapamicina in associazione o meno a CNI e/o steroidi, un gruppo in terapia con everolimus in associazione o meno a CNI e/o steroidi e un gruppo in terapia con CNI in associazione o meno a steroidi. I tre gruppi, comprendenti 48 pazienti in totale, sono stati paragonati per ogni variabile presa in considerazione (Tabella 1). Durante la selezione dei pazienti si è proceduto con l'esclusione di alcune categorie di soggetti. Pazienti con anamnesi neoplastica pre e/o post-trapianto sono stati esclusi in ragione della capacità di alcune linee tumorali di produrre TSP-1, pazienti con valore di creatinina sierica superiore a 3 mg/dL, non sono stati inclusi per la probabile alterazione della secrezione di TSP-1 a causa della condizione di uremia associata.

Lo scopo di tale analisi è stato quello di evidenziare eventuali differenze statisticamente significative

| | TERAPIA ID | | | TEST ANOVA (p) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| | RAPA (N=17) | EVE (N=13) | CNI (N=18) | |
| Variabili Riceventi | | | | |
| PRE-TRAPIANTO | | | | |
| <i>Età media (anni)</i> | 58,5 (D.S.=8,8) | 57,6 (D.S.=9,3) | 55,8 (D.S.=14) | 0,7 |
| <i>PRA % ultimo siero</i> | 10,2 (D.S.=21,2) | 0,15 (D.S.=0,55) | 1,7 (D.S.=7,3) | 0,09 |
| <i>PRA % max</i> | 18,8 (D.S.=32,7) | 0,3 (D.S.=0,8) | 5,3 (D.S.=18,8) | 0,06 |
| | | | | CHI – SQUARE (p) |
| <i>Sesso</i> | | | | |
| Maschi | 41% (n=7) | 69% (n=9) | 44% (n=8) | 0,26 |
| Femmine | 59% (n=10) | 31% (n=4) | 56% (n=10) | |
| <i>Malattia di base</i> | | | | |
| IRC di ndd | 12% (n=2) | 0% (n=0) | 11% (n=2) | 0,1 |
| APKD | 35% (n=6) | 23% (n=3) | 5% (n=1) | |
| Glomerulopatie | 24% (n=4) | 38% (n=5) | 61% (n=11) | |
| Diabete | 5% (n=1) | 0% (n=0) | 11% (n=2) | |
| M. interstiziali | 24% (n=4) | 23% (n=3) | 5% (n=1) | |

| | | | | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| M. vascolari | 0% (n=0) | 16% (n=2) | 11% (n=2) | |
| TRAPIANTO | | | | |
| <i>N° trapianti</i> | | | | |
| n=1 | 88% (n=15) | 100% (n=13) | 100% (n=18) | 0,15 |
| 1<n> 2 | 12% (n=2) | 0% (n=0) | 0% (n=0) | |
| DGF % | 18% (n=3) | 31% (n=4) | 22% (n=4) | 0,6 |
| POST-TRAPIANTO | | | | TEST ANOVA (p) |
| <i>Durata terapia ID (mesi)</i> | 63,47 (D.S.=45,4) | 30,23 (D.S.=18,8) | 81,55 (D.S.=61,8) | 0,54 |
| <i>Durata trapianto (mesi)</i> | 99 (D.S.=46,7) | 45,8 (D.S.=18,3) | 79,2 (D.S.=59,2) | 0,01 |
| <i>Crs (mg/dL)</i> | 1,67 (D.S.=0,6) | 1,67 (D.S.=0,7) | 1,39 (D.S.=0,4) | 0,23 |
| <i>BcrC (mL/min)</i> | 55,6 (D.S.=24,1) | 60,8 (D.S.=28,9) | 69,8 (D.S.=57,2) | 0,56 |
| <i>PTO (g/die)</i> | 0,45 (D.S.=0,7) | 0,34 (D.S.=0,4) | 0,23 (D.S.=0,1) | 0,32 |
| <i>% di rigetti acuti</i> | 5% (n=1) | 5% (n=1) | 11% (n=2) | 0,7 |

Tab 1: Confronto tra i tre gruppi per le variabili pre-trapianto, trapianto e post-trapianto. I valori indicati per le variabili: età media al trapianto, PRA ultimo siero e max, malattia di base, durata terapia ID, durata trapianto, Crs, BcrC, PTO sono espressi come media e la DS è indicata tra parentesi. Le restanti variabili sono indicate come percentuali sul totale della popolazione. La probabilità (p) è stata calcolata con test ANOVA per le variabili continue e con test chi-square per le variabili discrete.

Per quanto riguarda le *variabili pre-trapianto*, né per l'età media al trapianto né per il PRA (storico massimo/riferito all'ultimo siero testato) né per il sesso si sono evidenziate differenze statisticamente significative ($p > 0,05$). La malattia di base è stata studiata alla luce di quanto osservato in letteratura sulla secrezione di trombospondina-1 da parte delle cisti dei reni policistici. I pazienti affetti da nefropatia policistica, potrebbero inoltre aver assunto mTORi precedentemente al trapianto come terapia complementare per il trattamento della patologia di base [207].

Neppure la malattia di base è risultata essere statisticamente differente nei tre gruppi di pazienti presi in esame ($p > 0,05$).

Si può quindi affermare che le tre popolazioni siano sovrapponibili dal punto di vista anagrafico-anamnestico.

Se consideriamo il “*record trapianto*”, il numero di trapianti non è statisticamente differente nelle tre popolazioni studiate ($p > 0,05$), così come non emergono differenze per quanto riguarda la variabile DGF. Tale dato risulta di particolare

rilievo se si considera che l'insorgenza di DGF determina un aumento documentato del rischio di sviluppare un rigetto d'organo, situazione che potrebbe provocare una variazione significativa della percentuale di T_{REG} e B_{REG} circolanti.

Non emergono differenze statisticamente significative neppure per quanto concerne le variabili post-trapianto, fatta eccezione per la durata del trapianto.

La durata della terapia immunosoppressiva, intesa come intervallo di tempo in cui la terapia è stata effettivamente assunta, non risulta statisticamente differente nei tre gruppi di pazienti ($p < 0,05$). Tale parametro si discosta dalla durata del trapianto in quanto, le linee guida riguardanti gli schemi immunosoppressivi, osservate nel nostro centro, non considerano gli mTORi come farmaci da inserire in terapia *ab initio*.

L'unica eccezione consiste in un ristretto gruppo di pazienti arruolati in un trial denominato "Evidence" che prevedeva l'inserimento dell'everolimus in associazione alla ciclosporina, nell'immediato post-trapianto.

| | TERAPIA ID | | | Chi-SQUARE (p) |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| | RAPA (N=17) | EVE (N=13) | CNI (N=18) | |
| Durata terapia ID (mesi) | | | | |
| < 36 mesi | 23,5% (n=4) | 38% (n=5) | 17% (n=3) | 0,07 |
| 36 < t > 60 mesi | 23,5% (n=4) | 54% (n=7) | 28% (n=5) | |
| > 60 mesi | 53% (n=9) | 8% (n=1) | 55% (n=10) | |

Tab. 2: confronto fra i tre campioni per la variabile durata terapia immunosoppressiva. La variabile è espressa come percentuale sul totale della popolazione e il numero assoluto è indicato tra parentesi. La probabilità (p) è stata calcolata con test chi-square.

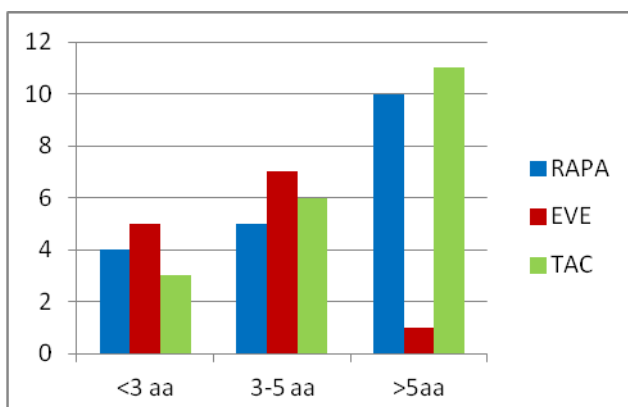


Fig. 17: Confronto fra i tre campioni per la variabile durata terapia immunosoppressiva.

Come si evince dalla tabella 2 e dalla figura 17, il numero di pazienti che assumono everolimus da più di cinque anni è nettamente inferiore rispetto a quello degli altri due gruppi alla stessa tempistica. Tale *bias* è dovuto alla più recente introduzione sul mercato, da parte delle industrie farmaceutiche, dell'everolimus rispetto alla rapamicina (capostipite della classe degli m-TORi) e al tacrolimus.

La variabile creatinina sierica risulta più elevata nel gruppo rapamicina e nel gruppo everolimus anche se è da tenere presente che l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative ($p < 0,05$). Tale condizione è da imputarsi al fatto che la maggior parte dei pazienti inclusi nei primi due gruppi hanno effettuato la conversione ad uno dei due farmaci della classe degli m-TOR inibitori sulla base di un referto nefrobiologico compatibile con nefrotossicità da CNI. Sono stati infatti esclusi tutti i trapiantati che avevano eseguito la stessa conversione per cause neoplastiche o riferite alla malattia di base (nefropatia policistica).

Per quanto riguarda la motivazione neoplastica, la scelta è stata effettuata alla luce di quanto è noto in letteratura, sulla produzione di TSP-1 da parte di alcune linee tumorali [208]. Alcune cellule neoplastiche secernono infatti elevati livelli di TSP-1.

| | TERAPIA ID | | |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| | mTORi (n=30) | CNI (n=18) | TEST T (p-value) |
| VARIABILI RICEVENTI | | | |
| PRE-TRAPIANTO | | | |
| <i>Età media (anni)</i> | 58,1 (D.S.=8,7) | 55,8 (D.S.=14) | 0,48 |
| <i>% PRA ult siero</i> | 5,9 (D.S.=16,3) | 1,7 (D.S.=7,3) | 0,31 |
| <i>% PRA max</i> | 10,8 (D.S.=25,6) | 5,3 (D.S.=18,8) | 0,44 |
| | | | CHI – QUADRATO (p) |
| <i>Sesso</i> | | | |
| Maschi | 53% (n=16) | 44% (n=8) | 0,55 |
| Femmine | 47% (n=14) | 56% (n=10) | |
| <i>Malattia di base</i> | | | |
| IRC di ndd | 6% (n=2) | 11% (n=2) | |
| APKD | 30% (n=9) | 5% (n=1) | |

| | | | |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Glomerulopatie | 30% (n=9) | 61% (n=11) | 0,1 |
| Diabete | 3% (n=1) | 11% (n=2) | |
| M. interstiziali | 23% (n=7) | 5% (n=1) | |
| M. vascolari | 6% (n=2) | 11% (n=2) | |
| TRAPIANTO | | | |
| <i>N° trapianti</i> | | | |
| n=1 | 93% (n=28) | 100% (n=18) | 0,78 |
| 1<n> 2 | 7% (n=2) | 0% (n=0) | |
| % DGF | 23% (n=7) | 22% (n=4) | 0,9 |
| POST-TRAPIANTO | | | TEST T |
| | | | (p) |
| <i>Durata terapia ID (mesi)</i> | 51,7 (D.S.=40,2) | 81,5 (D.S.=61,8) | 0,2 |
| <i>Durata trapianto (mesi)</i> | 75,9 (D.S.=44,6) | 79,2 (D.S.=59,2) | 0,83 |
| <i>Creatininemia (mg/dL)</i> | 1,7 (D.S.=0,7) | 1,4 (D.S.=0,4) | 0,07 |
| <i>BcrC (mL/min)</i> | 59,3 (D.S.=26,1) | 69,8 (D.S.=57,2) | 0,38 |
| <i>Proteinuria (g/die)</i> | 0,4 (D.S.=0,6) | 0,2 (D.S.=0,1) | 0,2 |
| <i>% di rigetti acuti</i> | 1% (n=3) | 11% (n=2) | 0,56 |

Tab. 3: Confronto tra i gruppi mTORi (costituito dall'associazione dei due gruppi rapamicina ed everolimus) e CNI per le variabili pre-trapianto, trapianto e post- trapianto. I valori indicati per le variabili: età media al trapianto, PRA ultimo siero e max, malattia di base, durata terapia ID, durata trapianto, Crs, BcrC, PTO sono espressi come media e la deviazione standard è indicata tra parentesi. Le restanti variabili sono indicate come percentuali sul totale della popolazione. La probabilità (p) è stata calcolata con test ANOVA per le variabili continue e con test chi-square per le variabili discrete.

A conferma di quanto osservato in tabella 1, l'associazione dei due gruppi, rapamicina ed everolimus, non dimostra di essere statisticamente differente, per le variabili considerate, rispetto al campione di controllo. Si può pertanto affermare che i tre campioni siano sovrapponibili.

ESPERIMENTI SU SANGUE E URINE DEI PAZIENTI IN STUDIO

Analisi citofluorimetrica delle popolazioni linfocitarie T_{REG} , T_{MEM} , B_{REG} , B_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti in studio

Le popolazioni linfocitarie T_{REG} , T_{MEM} , B_{REG} , B_{MEM} sono state quantificate e caratterizzate fenotipicamente, tramite citofluorimetria, nel sangue periferico dei tre campioni di pazienti selezionati. L'analisi è stata condotta al fine di studiare l'espressione delle popolazioni linfocitarie considerate, in relazione al differente trattamento immunosoppressivo assunto.

I linfociti T regolatori $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ sono stati quantificati a partire dai PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) isolati dai campioni di sangue periferico prelevati ad ogni paziente.

I linfociti T memoria $CD4^+CD4R0^+$, i linfociti B regolatori $CD19^+Tim-1^+$ e i linfociti B memoria $CD19^+CD27^+$ sono stati invece quantificati a partire da sangue intero.

La percentuale di linfociti T_{REG} risulta essere più elevata nei pazienti appartenenti al gruppo rapamicina ed everolimus rispetto al gruppo di controllo tacrolimus (figura 18A). Tra i due gruppi in terapia con mTORi non vi è una differenza di particolare rilievo.

Tale osservazione è confermata da quanto emerge in figura 18B, in cui i due gruppi rapamicina ed everolimus sono considerati come un unico campione e così paragonati al gruppo CNI.

I risultati ottenuti supporterebbero quindi le conoscenze relative alla relazione tra la rapamicina ed i T regolatori. È da tempo dimostrata in letteratura la capacità della rapamicina di espandere il pool di T_{REG} ; al contrario ciò che ancora non è provato è il ruolo dell'everolimus nell'induzione degli stessi T_{REG} , sebbene tale farmaco appartenga anch'esso alla classe degli mTORi.

Come è evidente in figura 18A, i risultati dimostrano che anche nel sangue prelevato ai pazienti in trattamento con everolimus, si rileva una percentuale di T_{REG} più elevata rispetto al gruppo trattato con CNI.

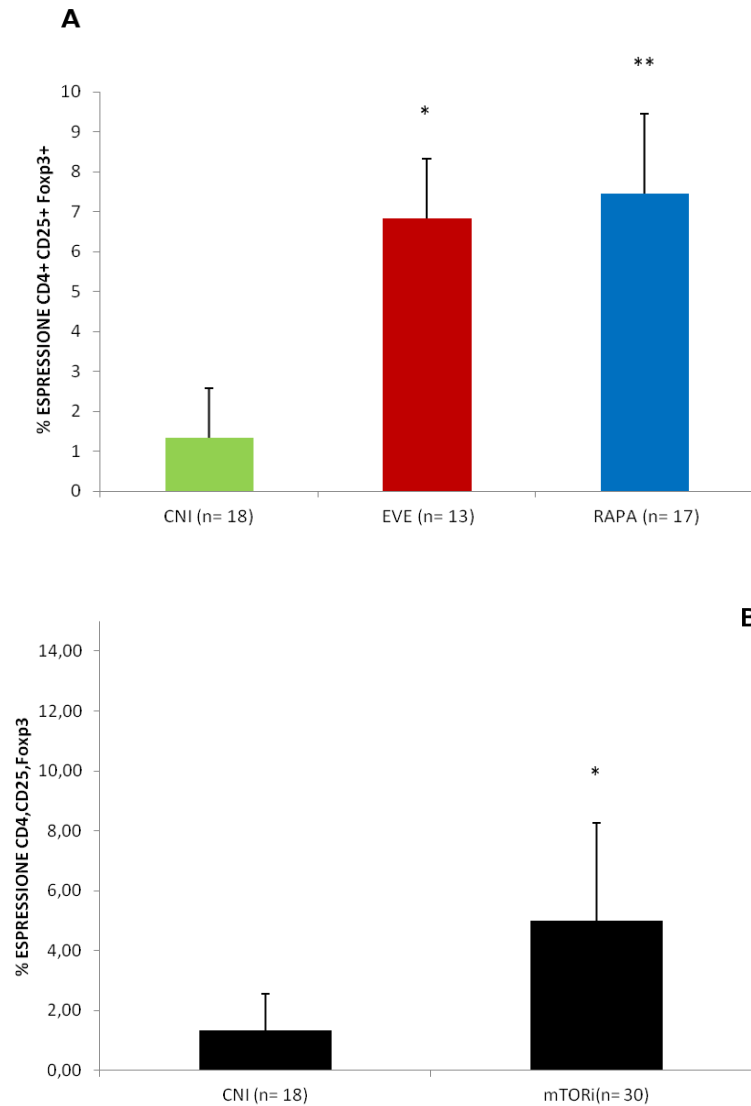


Fig. 18: (A) Valutazione mediante analisi FACS, della percentuale dei T_{REG} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi RAPA, EVE e CNI (* p<0,05 RAPA vs CNI) (** p<0,05 EVE vs CNI). (B) valutazione mediante analisi FACS, della percentuale dei T_{REG} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi mTORi e CNI (* p<0,05 mTORi vs CNI).

Per quanto riguarda i T memoria, la media percentuale di tutti i campioni analizzati è risultata sovrapponibile in tutte e tre le popolazioni di pazienti incluse nello studio, sebbene il dato non sia statisticamente significativo (figura 19A). Quando considerato come unico gruppo il campione mTOR presenta invece una percentuale di T memoria maggiore rispetto al controllo CNI (figura 19B). Neppure in tal caso tuttavia, il dato risulta statisticamente significativo e la differenza osservata nell'espressione dei T_{MEM} nei due gruppi non può essere quindi considerata valida.

Tale risultato si discosta da quanto sostenuto da alcuni studi secondo cui la rapamicina indurrebbe la differenziazione dei T in T memoria, esercitando un effetto di stimolazione dell'immunità innata [209].

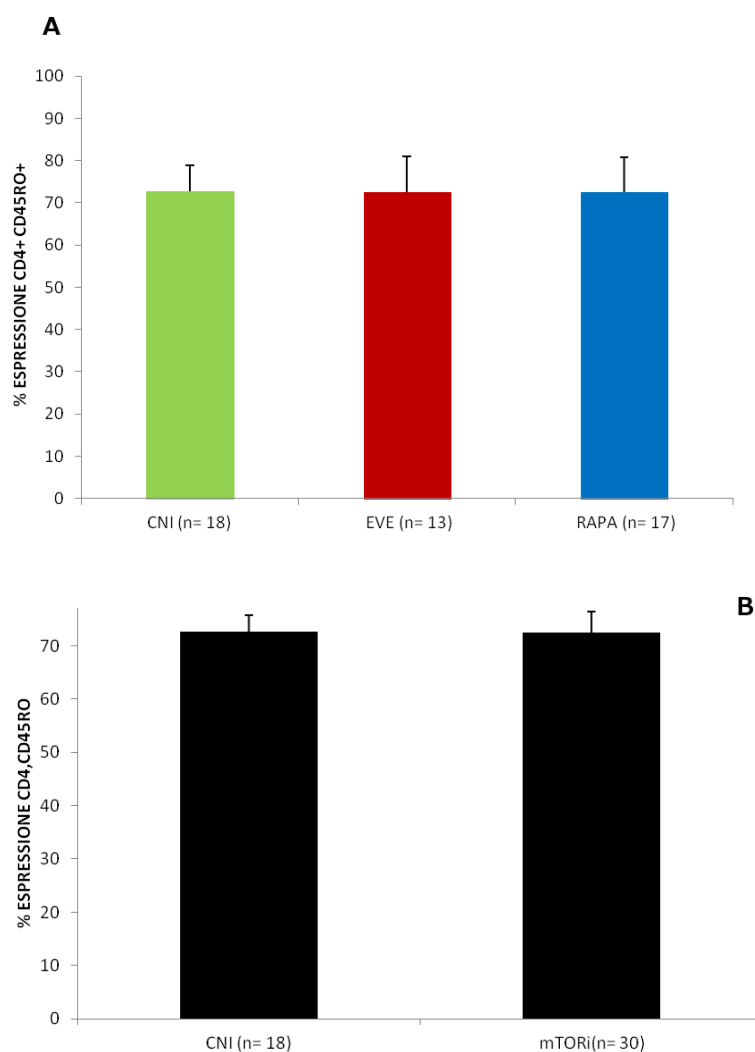


Fig. 19: (A) Valutazione mediante analisi FACS, della percentuale dei T_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi RAPA, EVE e CNI. (B) Valutazione mediante analisi FACS, della percentuale dei T_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi mTORi e CNI.

La percentuale dei B_{REG} appare inferiore nel gruppo CNI rispetto ai gruppi rapamicina ed everolimus, sia quando considerati separatamente (figura 20A) che come unico gruppo (figura 20B). Il dato ottenuto suggerisce un ruolo di induzione della popolazione B regolatrice da parte dei farmaci appartenenti alla classe degli mTORi. Contrariamente a quanto già dimostrato in letteratura per quel che riguarda i T_{REG}, l'effetto degli mTORi sulla differenziazione dei linfociti B in B_{REG} non era mai stato valutato in precedenza.

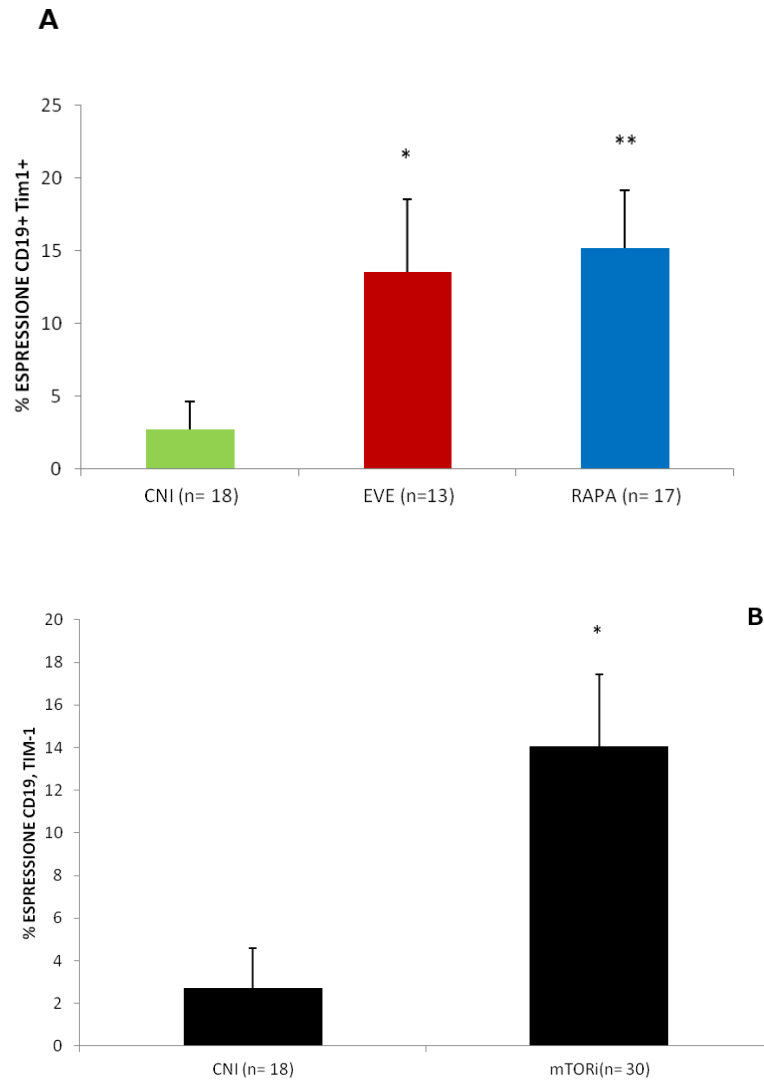


Fig. 20: (A) Valutazione mediante analisi FACS, della percentuale dei B_{REG} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi RAPA, EVE e CNI (* p<0,05 RAPA vs CNI) (** p<0,05 EVE vs CNI). (B) valutazione mediante analisi FACS, della frequenza dei B_{REG} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi mTORi e CNI (* p<0,05 mTORi vs CNI).

Come si evince dalla figura 21A e 21B, la percentuale di linfociti B memoria risulta più elevata nei gruppi rapamicina ed everolimus sia quando considerati separatamente che come unico gruppo. Tuttavia tale dato non è statisticamente significativo e non può essere considerato rilevante.

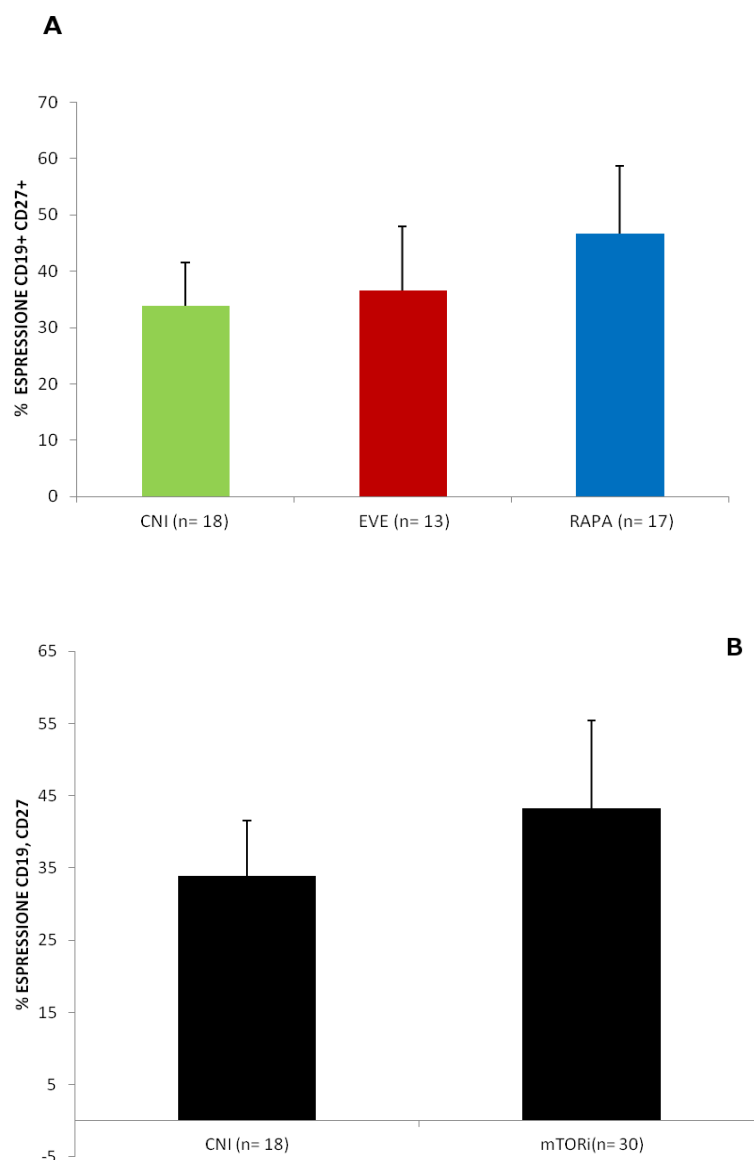


Fig. 21: (A) valutazione mediante analisi FACS, della frequenza dei B_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi RAPA, EVE e CNI. (B) valutazione mediante analisi FACS, della frequenza dei B_{MEM} nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi mTORi e CNI.

Non è ancora chiaro, in letteratura, quale sia il ruolo degli mTORi nel processo di differenziazione dei linfociti B e quale effetto rivestano i farmaci di questa classe nell'espansione del *pool* dei B memoria. Il risultato da noi ottenuto dimostrerebbe che nessuna differenza statisticamente significativa esiste tra il trattamento con mTORi e CNI per quanto riguarda l'induzione dei B_{MEM}.

Valutazione del livello ematico di TSP-1 nei pazienti in studio

La concentrazione ematica di TSP-1 è stata valutata mediante saggio ELISA eseguito sui campioni di sangue dei pazienti inclusi nello studio. Per ogni campione la concentrazione è stata ricavata a partire dal valore di assorbanza ottenuto dalla lettura della piastra ELISA con uno spettrofotometro, grazie all'elaborazione di una retta di regressione e della sua funzione.

Il plasma, ottenuto in un primo tempo da ogni prelievo ematico per centrifugazione, è stato diluito per essere successivamente testato tramite ELISA.

La concentrazione di TSP-1 ematica espressa in ng/mL risulta notevolmente più alta nei pazienti in trattamento con rapamicina ed everolimus rispetto ai controlli (figura 22A e B). Tale dato, statisticamente significativo, supporta l'ipotesi espressa in questo lavoro, secondo cui i farmaci della classe degli mTOR inibitori sarebbero in grado di stimolare l'aumento del rilascio di TSP-1 da parte delle cellule secernenti la proteina.

I nostri risultati sembrerebbero dunque dimostrare che i leucociti circolanti ed in particolare i linfociti, le piastrine, le cellule endoteliali ed epiteliali possono incrementare la quota di TSP-1 rilasciata nel torrente circolatorio, se stimolati con mTORi. Nessun lavoro scientifico è stato pubblicato a riguardo, ad eccezione dello studio condotto dal gruppo di Camussi su cellule epiteliali tubulari [200] da cui emerge l'importanza del ruolo della stimolazione con rapamicina nell'induzione della produzione di TSP-1 nelle TEC.

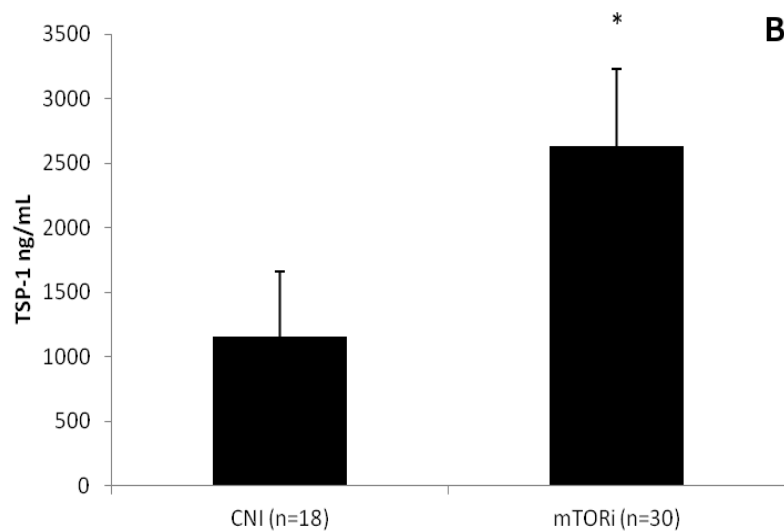
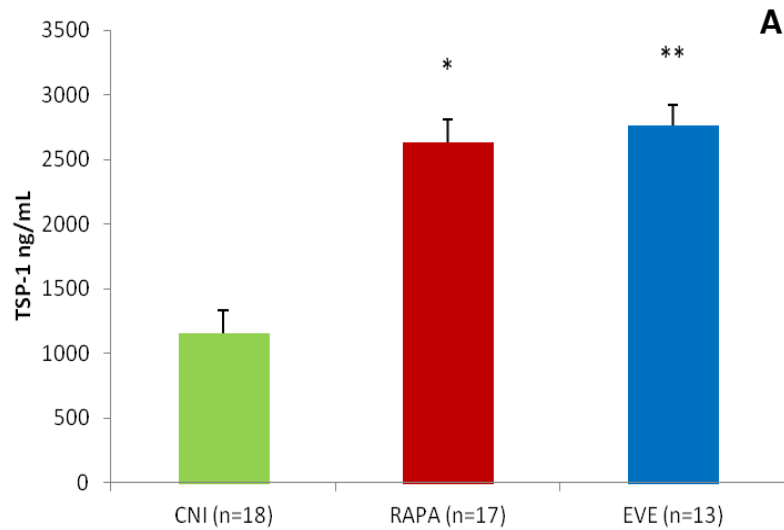


Fig. 14: (A) Concentrazione media di TSP-1 (ng/mL) nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi RAPA, EVE e CNI (* $p < 0,05$ RAPA vs CNI) (** $p < 0,05$ EVE vs CNI). (B) Concentrazione media di TSP-1 (ng/mL) nel sangue periferico dei pazienti dei gruppi mTORi e CNI (* $p < 0,05$ mTORi vs CNI). I valori medi di TSP-1 corrispondenti ad ogni paziente sono stati ottenuti tramite l'esecuzione di tre saggi ELISA indipendenti.

ESPERIMENTI IN VITRO SUI LINFOCITI

I linfociti T e B, sui quali sono stati eseguiti tutti gli esperimenti di seguito riportati, sono stati isolati a partire da PBMC, estratti da *buffy coat* destinati a scopo di ricerca, mediante *sorting* immunomagnetico.

Differenziazione dei linfociti T e B nelle popolazioni regolatorie e memoria in seguito a stimolazione con farmaci di diverse classi

La caratterizzazione linfocitaria di T_{REG}, T_{MEM}, B_{REG}, B_{MEM} è stata eseguita tramite analisi citofluorimetrica su PBMC isolati da *buffy coat*. Dai PBMC ottenuti tramite stratificazione, sono stati isolati i linfociti T e B, a loro volta stimolati con 20 ng/mL di rapamicina, 20 ng/mL everolimus e 20 ng /mL di tacrolimus e successivamente incubati per 72 h.

Le percentuali delle differenti popolazioni sono state ottenute grazie ad analisi FACS eseguite sugli stessi linfociti marcati per i *marker* di membrana specifici.

Dai risultati ottenuti in citofluorimetria emerge come la percentuale dei T regolatori aumenti rispetto al livello basale, quando stimolati con rapamicina ed everolimus (figura 23). L'espressione di tale popolazione sembrerebbe maggiormente indotta quando lo stimolo è costituito dall'everolimus, il cui ruolo in questo contesto (sebbene si tratti di un mTORi), non è mai stato indagato prima in letteratura.

Non emerge alcuna differenza statisticamente significativa tra la percentuale di T_{REG} a livello basale (veh) e la percentuale di T_{REG} ottenuta dopo stimolazione con tacrolimus. È possibile dunque ipotizzare che il tacrolimus non rivesta alcun ruolo nella differenziazione dei linfociti T verso la linea regolatoria e che non interferisca in alcun modo nel mantenimento del pool di T_{REG} circolanti.

I risultati ottenuti confermano invece quanto già noto in letteratura relativamente al ruolo della rapamicina nell'induzione dei T_{REG}.

Sembrerebbero inoltre dimostrare che l'effetto della stimolazione con EVE sia sovrapponibile, in tal senso, a quello della stimolazione con RAPA.

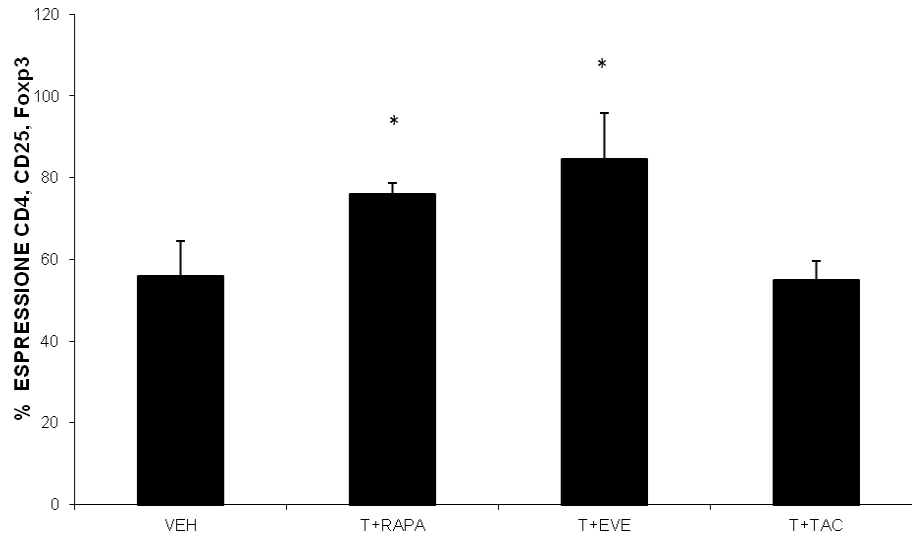


Fig. 23: Valutazione tramite analisi FACS della percentuale di espressione dei T_{REG} a livello basale (veh) e in seguito a stimolazione con RAPA, EVE, TAC. Veh: vehicol, TAC: tacrolimus. Gli stimoli RAPA ed EVE determinano un aumento dell'espressione dei T_{REG}. Il risultato è espresso come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle (* p<0,05 vs VEH).

I risultati ottenuti, per quanto riguarda la stimolazione con i farmaci sopra citati dei linfociti T memoria, rispecchiano l'andamento già evidenziato nelle analisi citofluorimetriche sul sangue periferico dei pazienti inclusi nello studio (figura 24).

Le percentuali di espressione dei linfociti T memoria appaiono più elevate nei campioni stimolati con rapamicina ed everolimus rispetto al controllo. Anche in questo caso tuttavia, il dato non può essere considerato significativo, non essendo state evidenziate differenze statisticamente significative tra i campioni T+RAPA vs VEH e T+EVE vs VEH.

Contrariamente a quanto emerso dallo studio delle popolazioni T memoria nel sangue dei pazienti in trattamento in CNi, lo studio FACS eseguito in questo caso, ha riportato una percentuale più elevata di T_{MEM} nel campione stimolato con tacrolimus rispetto al controllo. Il dato non risulta tuttavia statisticamente significativo.

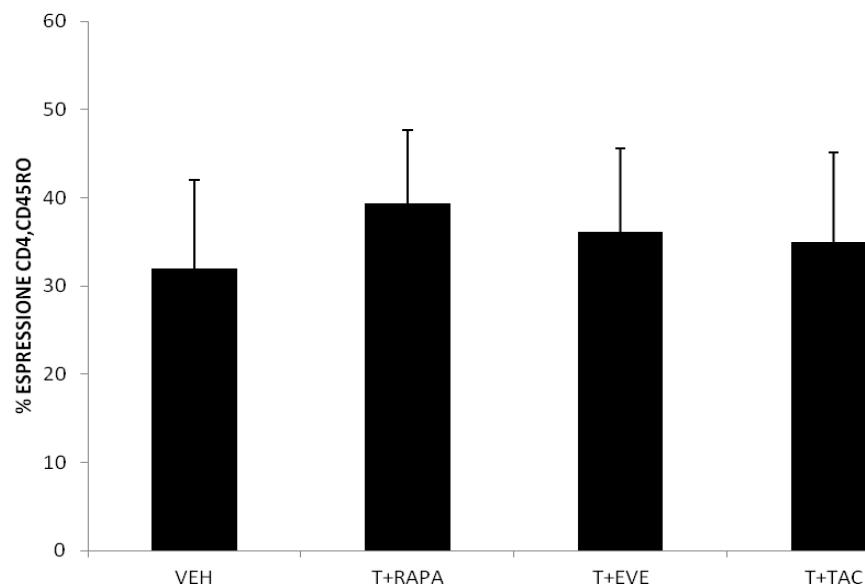


Fig. 24: Valutazione tramite analisi FACS, della percentuale di espressione dei T_{MEM} a livello basale (veh) e in seguito a stimolazione con RAPA, EVE, TAC. Gli stimoli RAPA, EVE e TAC determinano un aumento non statisticamente significativo dell'espressione dei T_{MEM} ($p > 0,05$). Il risultato è espresso come $media \pm DS$ dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle.

Come è possibile osservare in figura 25, i farmaci appartenenti alla classe degli mTORi favoriscono un incremento statisticamente significativo della differenziazione dei B in B regolatori rispetto al campione di controllo non stimolato. Tale dato risulta estremamente interessante per quanto riguarda l'intervento degli mTORi nell'induzione e mantenimento della tolleranza in ambito trapiantologico.

L'azione favorente della rapamicina nella conversione dei linfociti T verso la linea regolatoria risulta documentata da tempo in letteratura; ciò che ancora non è stato indagato è il ruolo dello stesso farmaco nella differenziazione dei B in B_{REG} .

Rimangono ancora da chiarire quali siano i mediatori molecolari dell'azione degli mTORi sulla conversione dei linfociti T e B in T_{REG} e B_{REG} .

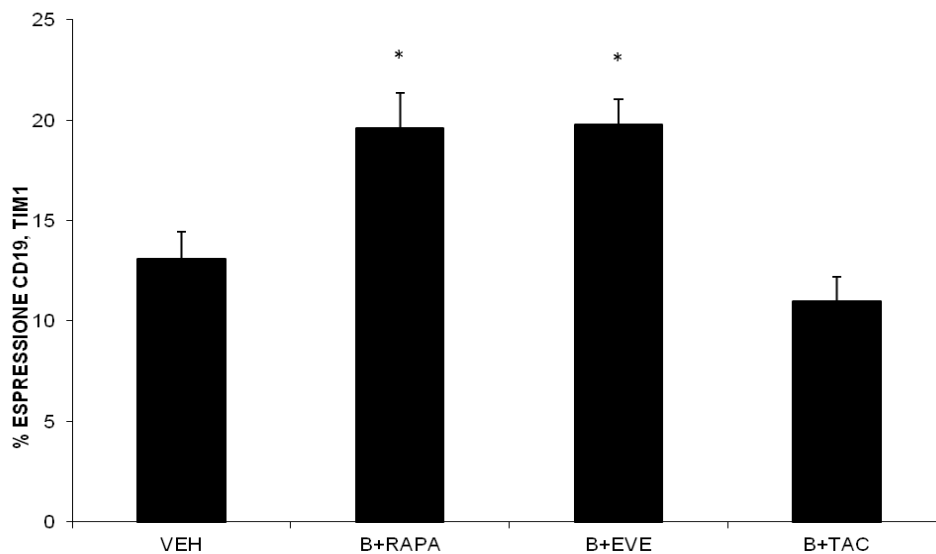


Fig. 25: Valutazione tramite analisi FACS, della percentuale di espressione dei B_{REG} a livello basale (veh) e in seguito a stimolazione con RAPA, EVE, TAC. La percentuale di B_{REG} appare più elevata nei campioni stimolati con RAPA ed EVE rispetto al controllo (VEH). Il risultato è espresso come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle (* p<0,05).

Come emerge in figura 26 la stimolazione con rapamicina, everolimus e tacrolimus produce un lieve incremento della percentuale dei linfociti B memoria rispetto al livello basale di espressione della popolazione. Non esistono tuttavia differenze statisticamente significative tra i diversi campioni.

Si può dunque supporre che né gli mTORi né il tacrolimus esercitino un effetto favorente l'espansione dei B_{MEM}.

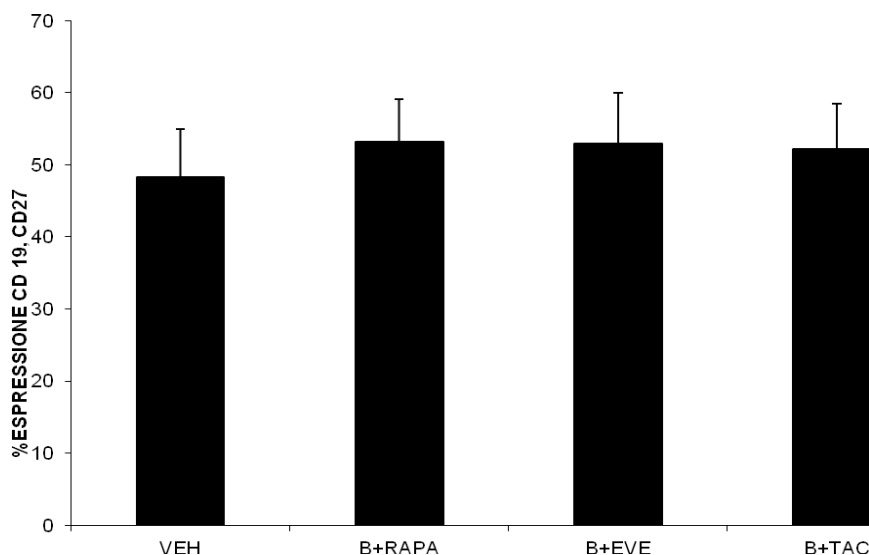


Fig. 26: Valutazione tramite analisi FACS della percentuale di espressione dei B_{MEM} a livello basale (veh) e in seguito a stimolazione con RAPA, EVE, TAC. Gli stimoli RAPA, EVE e TAC determinano un aumento non statisticamente significativo dell'espressione dei B_{MEM}. Il risultato è espresso come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle.

Valutazione della produzione di TSP-1 linfocitaria a livello basale

Al fine di testare la capacità delle cellule linfocitarie T e B di produrre e rilasciare TSP-1, è stata eseguita analisi real time PCR con primer specifici per la proteina, sull'RNA totale estratto dai linfociti in condizioni basali.

I risultati di tale esperimento hanno evidenziato la presenza di mRNA per la TSP-1 sia all'interno dei linfociti T (figura 27A) che nei linfociti B (figura 27B). Il numero del ciclo, inferiore nei T rispetto che nei B, al quale l'mRNA della proteina comincia ad essere amplificato induce ad ipotizzare che una maggior quota di TSP-1 venga prodotta all'interno dei linfociti B.

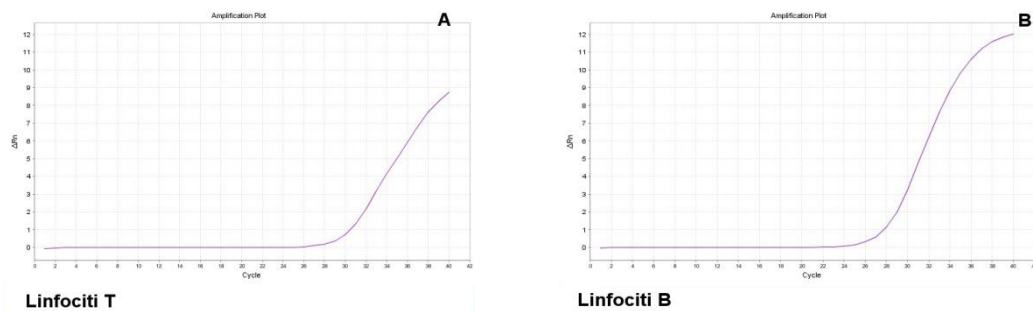


Fig. 27: (A) Analisi RT-PCR raffigurante la presenza di mRNA per TSP-1 all'interno dei linfociti T. (B) Analisi RT-PCR raffigurante la presenza di mRNA per TSP-1 all'interno dei linfociti B. Tale risultato è stato confermato a livello proteico dall'analisi citofluorimetrica eseguita sui linfociti T e B in condizioni basali.

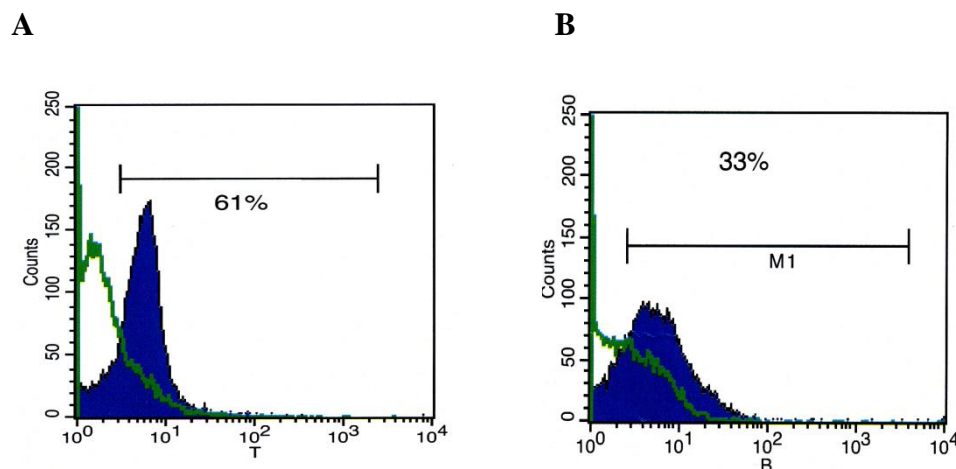


Fig. 28: (A) Valutazione espressione TSP-1 nei linfociti T e mediante analisi FACS. (B) Valutazione espressione TSP-1 nei linfociti B mediante analisi FACS.

Valutazione della produzione di TSP-1 linfocitaria dopo stimolazione con mTORi e TAC

Quale sia l'effetto dei farmaci della categoria degli mTORi sulla produzione e il rilascio di TSP-1 a livello linfocitario non è ancora noto.

Al fine di valutare se gli mTORi possano intervenire in tale processo, cellule T e B sono state incubate con rapamicina, everolimus e tacrolimus per 72 h. L'analisi citofluorimetrica eseguita in seguito ha evidenziato la percentuale di TSP-1 prodotta a livello dei linfociti stimolati in rapporto al campione non stimolato.

In figura 29 appare evidente come la stimolazione con rapamicina ed everolimus determini un incremento significativo della produzione di TSP-1 a livello dei linfociti T.

La stimolazione con tacrolimus, non provoca invece alcun effetto statisticamente significativo in tale processo.

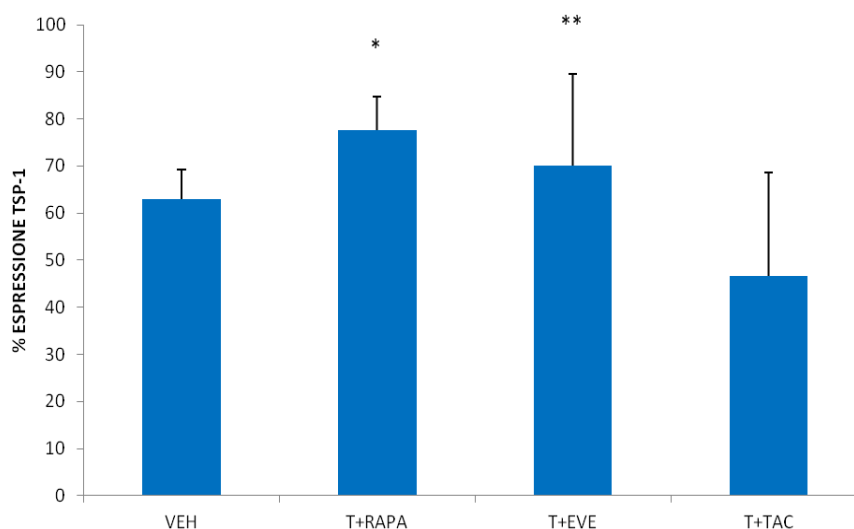


Fig. 29: Valutazione della produzione di TSP-1, mediante analisi FACS, a livello basale e dopo stimolazione con RAPA, EVE e TAC, in linfociti T incubati per 72 h con gli stimoli sopra citati. Il risultato è espresso come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle (* p<0,05 T+RAPA vs VEH), (** p<0,05 T+EVE vs VEH).

L'espressione a livello proteico della TSP-1 in linfociti B stimolati con mTORi risulta aumentata rispetto al livello basale (figura 30).

La stimolazione con tacrolimus non sembra invece determinare alcuna variazione statisticamente significativa nella produzione della proteina.

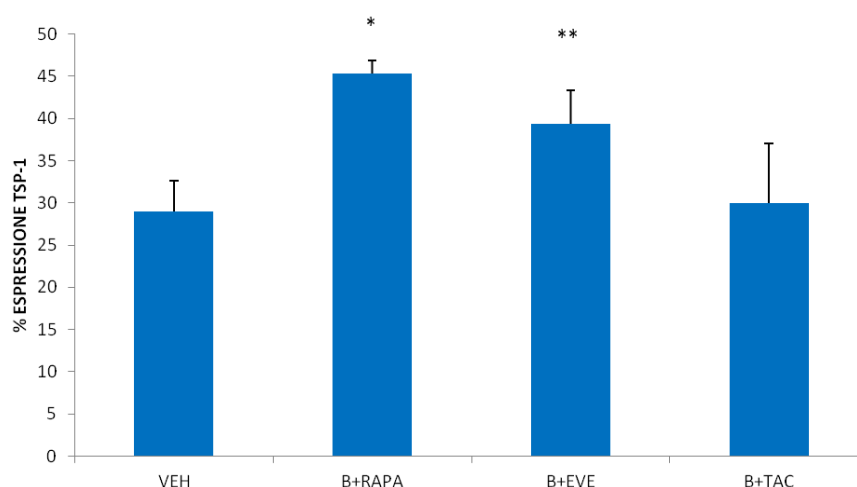


Fig. 30: Valutazione della produzione di TSP-1, mediante analisi FACS, a livello basale e dopo stimolazione con RAPA, EVE e TAC, in linfociti B incubati per 72 h con gli stimoli sopra citati. Il risultato è espresso come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con i diversi farmaci e il campione vehicle (* $p < 0,05$ B+RAPA vs VEH), (** $p < 0,05$ B+EVE vs VEH).

I risultati ottenuti nell'esperimento sopra riportato aprono interessanti prospettive per quanto riguarda la capacità degli mTORi di indurre la conversione linfocitaria verso la linea regolatoria.

È dimostrato in letteratura che la rapamicina stimola la conversione dei T in T_{REG}, così come è noto che la TSP-1 favorisce lo stesso processo; ciò che ancora non è dimostrato è quale sia o quali siano i mediatori dell'effetto della rapamicina sui linfociti T.

I risultati da noi ottenuti permettono di ipotizzare che proprio la TSP-1, essendo prodotta dai linfociti sotto lo stimolo degli mTORi, agisca da mediatore nell'induzione della differenziazione dei T in T_{REG} stimolata dagli mTORi stessi.

La rapamicina stimolerebbe dunque la produzione di TSP-1 da parte degli linfociti T, la quale a sua volta sarebbe in grado di indurre la differenziazione degli stessi T in T_{REG} grazie al legame con il CD47 presente sulla superficie linfocitaria.

Non è noto in letteratura se la rapamicina agisca sui linfociti B stimolandone la conversione a B_{REG}, così come accade per i T né se la TSP-1 favorisca l'aumento della secrezione di TSP-1 anche nelle cellule B.

I nostri risultati sembrerebbero suggerire che le stesse osservazioni proposte in merito ai linfociti T possano essere valide anche per i linfociti B.

Ruolo della TSP-1 nella differenziazione linfocitaria

A conferma di quanto già è noto in letteratura per i linfociti T, cellule linfocitarie T e B sono state stimulate con dosi crescenti di TSP-1 ricombinante umana (hrTSP-1), corrispondenti a 50-100-500 ng/mL, e quindi incubate per 48 h.

La percentuale di espressione di T e B regolatori per ogni dose di stimolazione è stata ottenuta mediante analisi FACS e quindi paragonata al livello basale (veh).

I risultati ottenuti per quanto riguarda i linfociti T regolatori (figura 31A) supportano quanto già è dimostrato in alcuni lavori scientifici: la stimolazione con hrTSP-1 espande il pool di linfociti T regolatori preesistente e l'espansione è dipendente dalla dose di stimolo. Il grafico sotto riportato mostra infatti un incremento della percentuale di T_{REG} proporzionale all'aumentare della dose di hrTSP-1.

Di particolare interesse è notare come lo stesso andamento osservato per i T_{REG}, sia evidente anche per i linfociti B regolatori (figura 31B), la cui relazione con la TSP-1 non è mai stata indagata prima in letteratura.

La percentuale di espressione di B regolatori aumenta sotto lo stimolo della rhTSP-1, rispetto al campione basale e l'aumento risulta anche in tal caso dose dipendente.

La stimolazione con hrTSP-1 inoltre non sembrerebbe rivestire alcun ruolo nella differenziazione dei linfociti T e B verso la linea memoria. La percentuale di T_{MEM} (figura 32A) risulta minimamente aumentata nei campioni stimolati con hrTSP-1 rispetto al livello basale, sebbene non si possa ritenere il dato valido in quanto non sono rilevabili differenze statisticamente significative. Per quanto riguarda i B_{MEM} (figura 32B), si è riscontrato un aumento della percentuale di lieve entità alla dose di stimolazione inferiore utilizzata. Tale dato, per altro non supportato dai risultati ottenuti con le altre dosi, è risultato statisticamente non significativo.

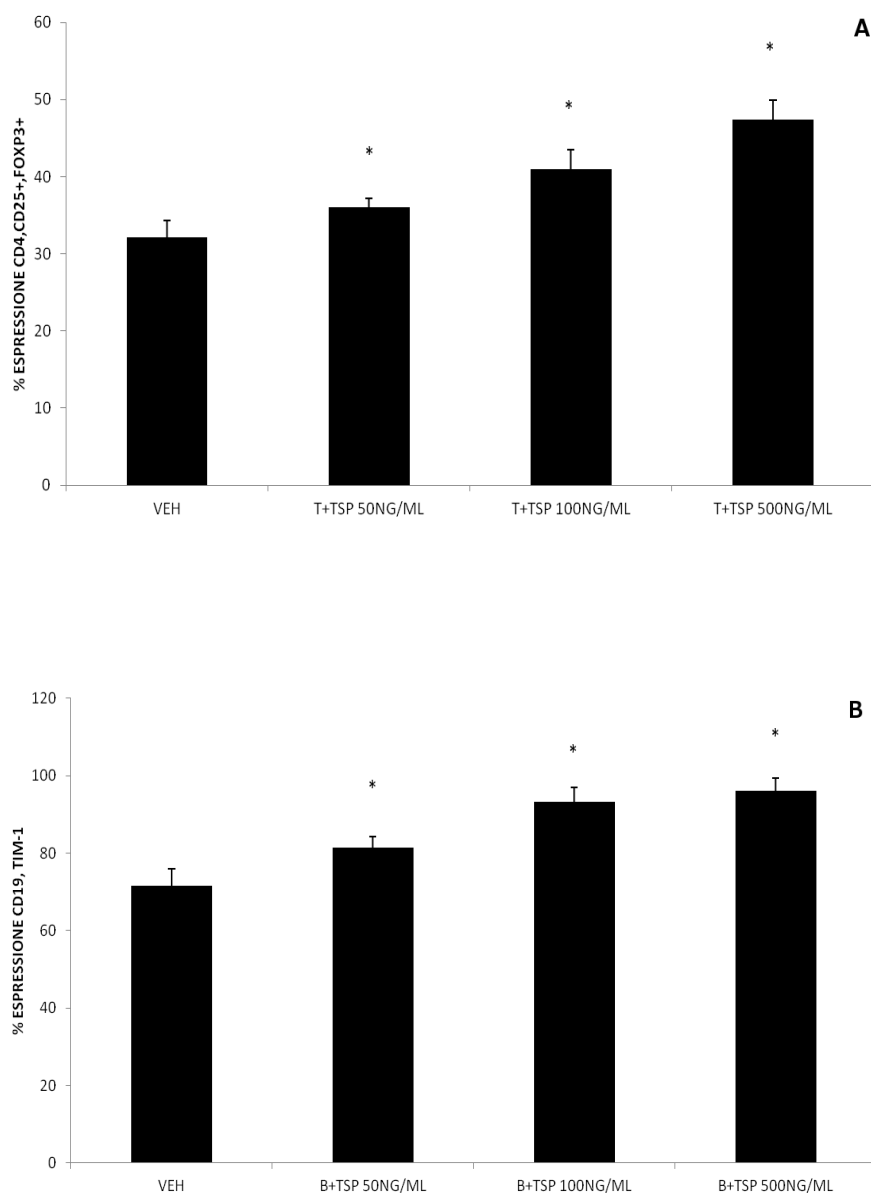


Fig. 31: (A) Variazione della percentuale di linfociti T_{REG} dopo stimolazione per 48 h, con dosi crescenti di hrTSP-1 in rapporto al livello basale (vehicle). (B) Variazione della percentuale di linfociti B_{REG} dopo stimolazione per 48 h, con dosi crescenti di hrTSP-1 in rapporto al basale (vehicle). La RAPA alla dose di 50 ng/mL induce un aumento significativo della percentuale di T e B regolatori, fino a raggiungere un picco alla dose massima utilizzata di 500 ng/mL. I risultati sono espressi come media±DS dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con dosi crescenti di hrTSP-1 e vehicle (* p<0,05 dosi crescenti di rapamicina vs VEH). Tre differenti esperimenti sono stati eseguiti, ottenendo risultati sovrapponibili.

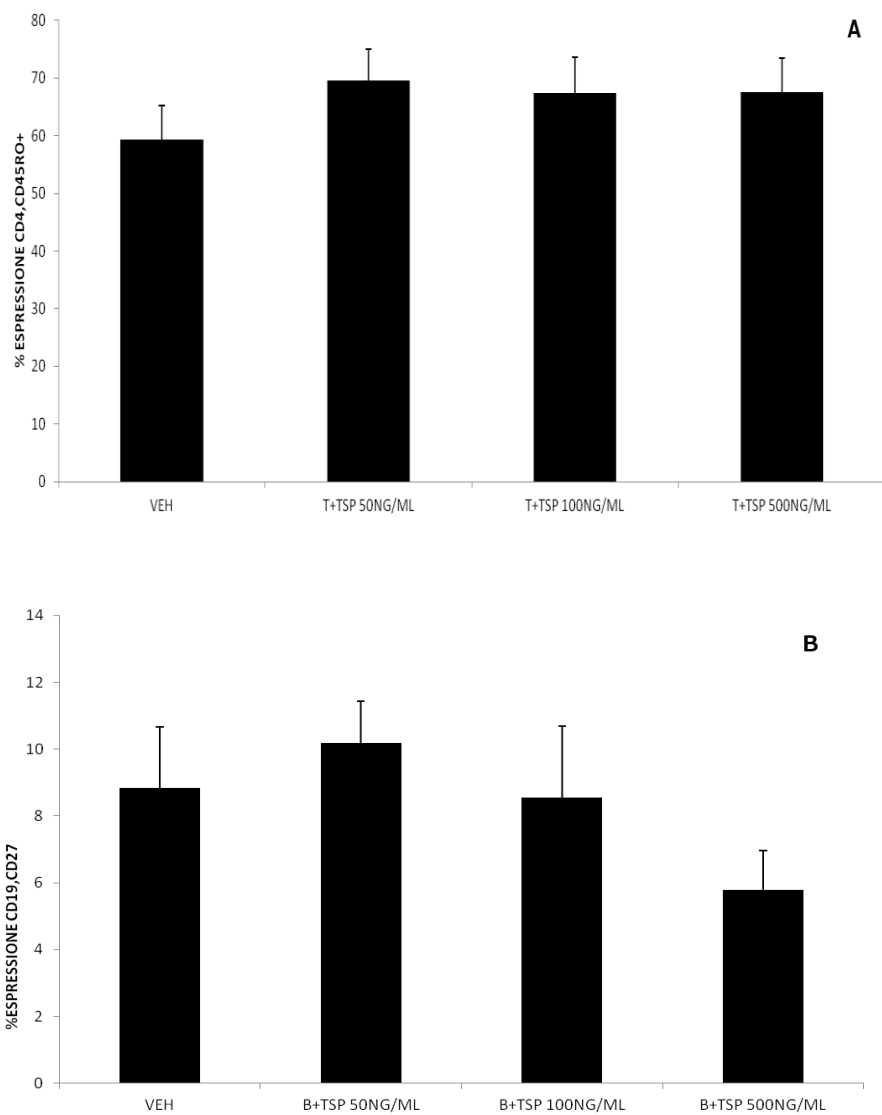


Fig. 32: (A) Variazione della percentuale di linfociti T_{MEM} dopo stimolazione per 48 h, con dosi crescenti di hrTSP-1 in rapporto al livello basale (vehicle). (B) Variazione della percentuale di linfociti B_{MEM} dopo stimolazione per 48 h, con dosi crescenti di hrTSP-1 in rapporto al basale (vehicle). I risultati sono espressi come $media \pm DS$ dei valori ricavati in tre diversi esperimenti. È stato eseguito il test T tra i campioni stimolati con dosi crescenti di hrTSP-1 e vehicle. Tre differenti esperimenti sono stati eseguiti, ottenendo risultati sovrapponibili.

ESPERIMENTI IN VITRO SULLE CELLULE RENALI

Modulazione della produzione di TSP-1 nelle cellule renali stimulate con RAPA/EVE/TAC

Cellule epiteliali tubulari renali (TEC) sono state stimulate con 40 ng/mL rapamicina, 40 ng/mL everolimus e 40 ng/mL tacrolimus, quindi incubate per 48 h, con FBS al 10%. La concentrazione di TSP-1 nel surnatante delle TEC è stata valutata mediante saggio ELISA.

Come emerge in figura 33, l'espressione di TSP-1 risulta significativamente più alta nelle TEC stimulate con rapamicina ed everolimus rispetto al livello basale. La stimolazione con tacrolimus non produce invece una variazione statisticamente significativa nella produzione di TSP-1.

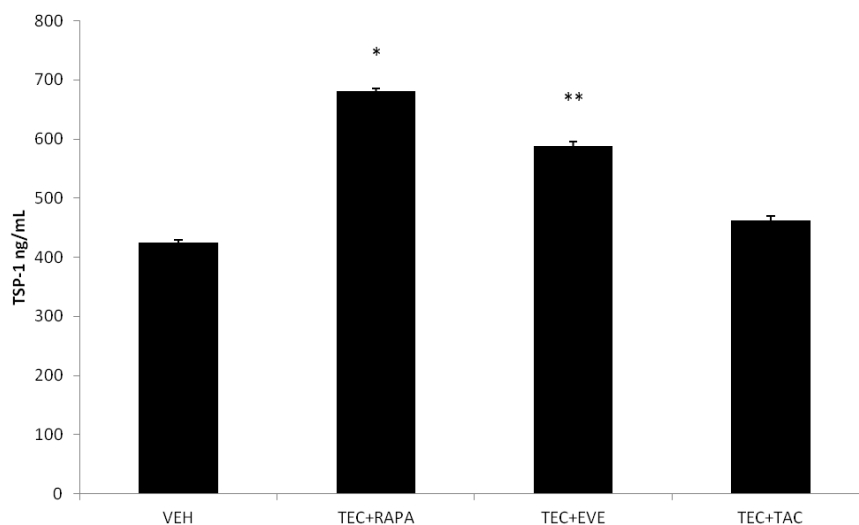


Fig. 33: Modulazione della produzione di TSP-1 nelle cellule epiteliali tubulari renali (TEC) trattate per 48 h con RAPA, EVE e TAC. I risultati sono espressi come media \pm DS dei valori ricavati in tre esperimenti indipendenti. È stato eseguito test T di Student tra i campioni stimolati con RAPA (* $p < 0,05$ TEC+RAPA vs TEC), con EVE (** $p < 0,05$ TEC+EVE vs TEC) e con TAC. Il grafico mostra un incremento della produzione di TSP-1 nei campioni stimolati con RAPA ed EVE rispetto al vehicle, dimostrato mediante saggio ELISA.

Tale dato conferma quanto già osservato, dal gruppo di Camussi nel 2006, in merito al livello di TSP-1 rilevato nel surnatante delle TEC stimolate con rapamicina [200]. Di nuovo riscontro è invece il ruolo dell'everolimus, che risulta sovrapponibile a quello svolto dalla rapamicina, nell'induzione del rilascio di TSP-1 nelle TEC.

I risultati ottenuti dimostrano dunque che le TEC così come i linfociti T e B, costituiscono una fonte importante di TSP-1, in grado di incrementare il rilascio della proteina sotto lo stimolo degli mTORi.

Quanto dimostrato sopra è stato ulteriormente confermato mediante analisi citofluorimetriche sulle TEC in condizioni basali e dopo stimolazione con mTORi e tacrolimus.

Cellule tubulari renali sono state stimolate con rapamicina (40 ng/mL), everolimus (40 ng/mL) e tacrolimus (40 ng/mL) con FBS al 10% e quindi incubate per 24 h. La percentuale di TSP-1 espressa è stata valutata mediante analisi FACS e dunque paragonata al *vehicle*.

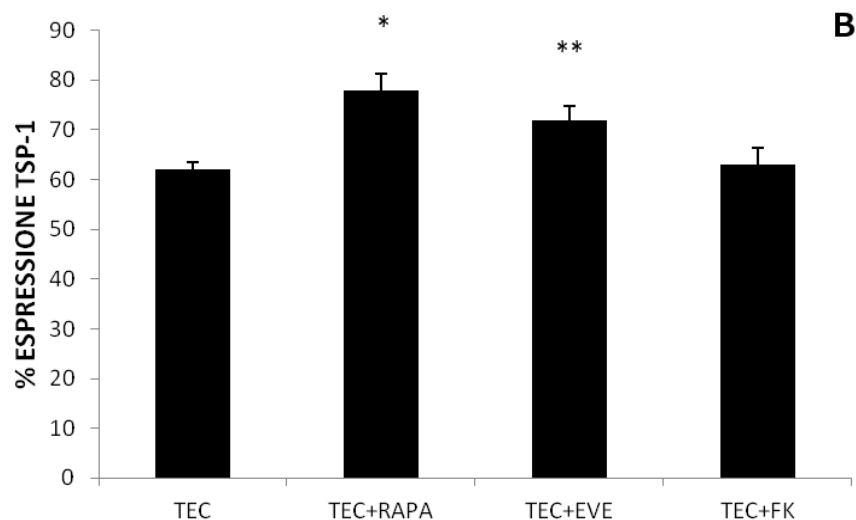


Fig. 34: Valutazione della produzione di TSP-1 nelle TEC, trattate con RAPA, EVE e TAC, mediante analisi FACS a 24h. I risultati sono espressi come media \pm DS dei valori ricavati in tre esperimenti indipendenti. È stato eseguito test T di Student tra i campioni stimolati con RAPA (* $p < 0,05$ TEC+RAPA vs TEC), con EVE (** $p < 0,05$ TEC+EVE vs TEC) e con TAC.

Come si può osservare in figura 33, l'incubazione con mTORi produce un incremento della sintesi di TSP-1 da parte delle TEC. L'analisi FACS dimostra un

aumento della percentuale di TSP-1, maggiormente evidente per il campione stimolato con rapamicina.

Tale schema sperimentale è stato inoltre realizzato per valutare l'espressione della TSP-1 anche nelle PEC. La percentuale di TSP-1 prodotta dall'endotelio peritubulare renale, è stata quindi determinata mediante analisi FACS eseguita a 24 h dalla stimolazione (figura 35).

Come si evince dal grafico sottostante, la produzione di TSP-1 risulta significativamente aumentata dopo stimolazione con mTORi, al contrario non subisce alcuna variazione dopo incubazione con tacrolimus.

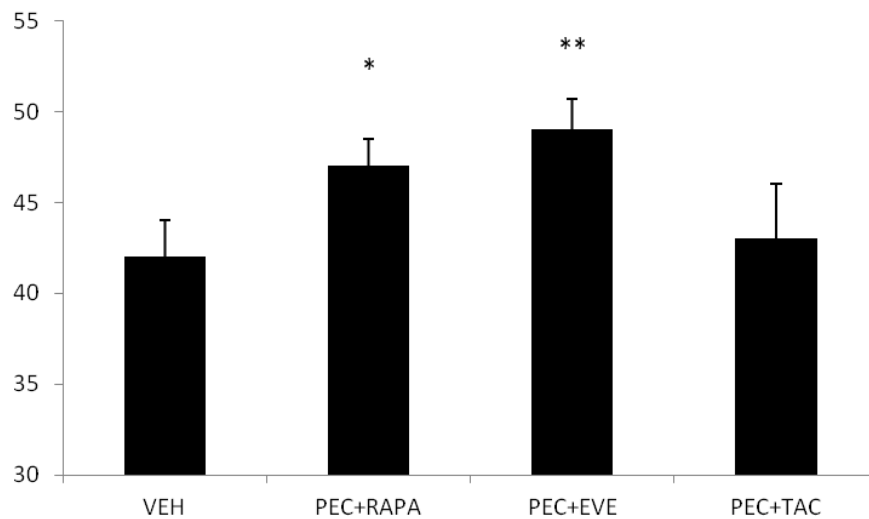


Fig. 35: Valutazione della produzione di TSP-1 nelle PEC, trattate con RAPA, EVE e TAC, mediante analisi FACS a 24 h dallo stimolo. I risultati sono espressi come media \pm DS dei valori ricavati in tre esperimenti indipendenti. È stato eseguito test T di Student tra i campioni stimolati con RAPA (* $p < 0,05$ HMEC+RAPA vs HMEC), con EVE (** $p < 0,05$ HMEC+EVE vs HMEC) e con TAC.

PARTE SECONDA

RIGETTO T CELLULO MEDIATO

Caratterizzazione delle MVs di origine dalle MSCs

Il nostro gruppo ha caratterizzato le MVs isolate dalle MSCs. Mediante analisi FACS sono state valutate le dimensioni delle MVs, che variano da 1 nm a 1 μm , con un valore medio di 135 nm (Fig 36) [371]. Con il FACS si è osservata la presenza di diverse molecole di adesione, notoriamente espresse sulla membrana delle MSCs come CD44, CD29, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ integrina, CD73, ma non $\alpha 6$ integrina. Le MVs inoltre non esprimono le molecole HLA di classe I a differenza delle cellule di origine (Fig. 36).

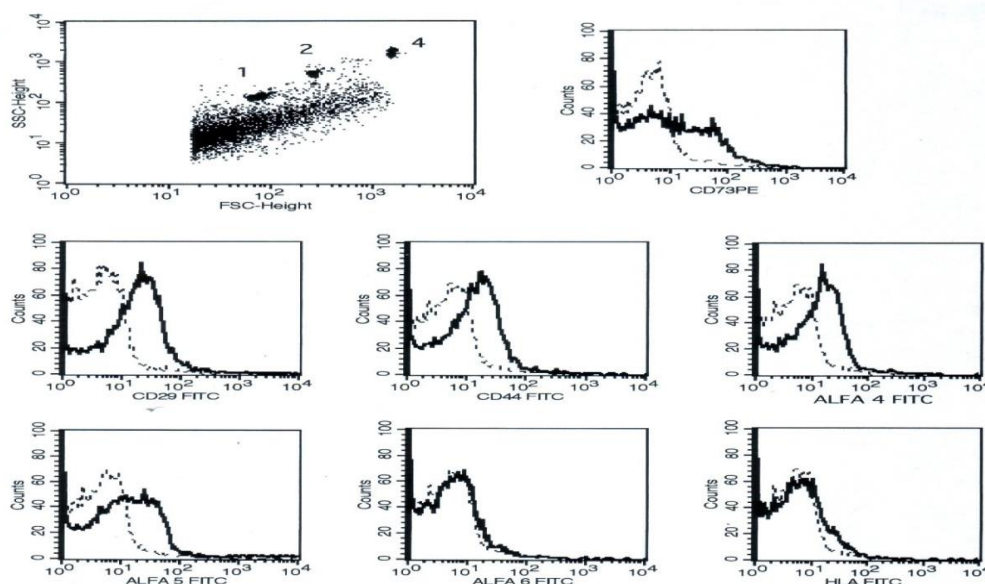


Fig. 36: Caratterizzazione mediante FACS delle MV di origine dalle MSCs.

Mediante l'analisi genica è stato possibile determinare che le MVs contengono vari mRNA coinvolti nei processi di immunoregolazione, nel controllo della trascrizione e della proliferazione cellulare e mRNA tipici della linea cellulare mesenchimale [371].

Caratterizzazione dei fattori immunoregolatori espressi dalle MSCs e dalle MVs

Abbiamo utilizzato l'analisi FACS e la qRT-PCR per determinare il contenuto genico e proteico delle MSCs e delle MVs, in particolare per testare la presenza di geni e proteine potenzialmente coinvolte nei meccanismi di immunotolleranza.

L'analisi FACS ha mostrato la presenza di alti livelli di Foxp3, TIM-1 e TSP-1 sia nelle MSCs che nelle MVs da esse derivate (Fig. 37).

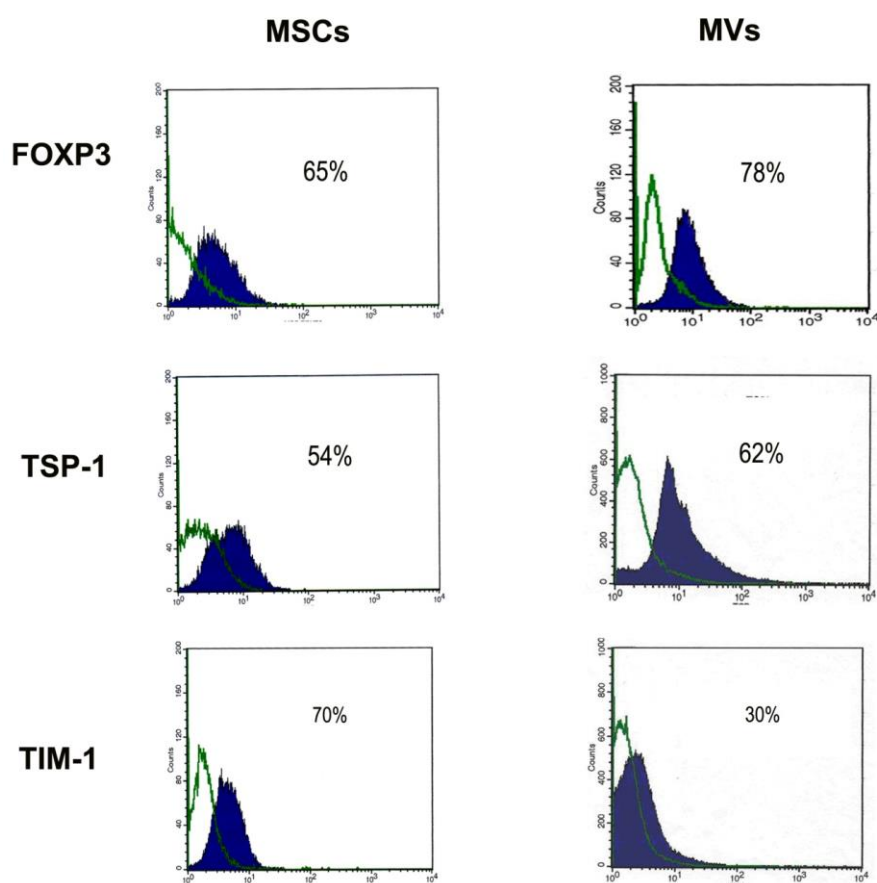


Fig. 37: Espressione di Foxp3, TSP-1 e TIM-1 nelle MSCs (a sinistra) e nelle MVs da esse originanti (pannello di destra)

L'analisi qRT-PCR ha confermato la presenza di mRNA codificante per TSP-1, Foxp3 e TIM-1 sia nelle MSCs che nelle MVs (Fig. 38)

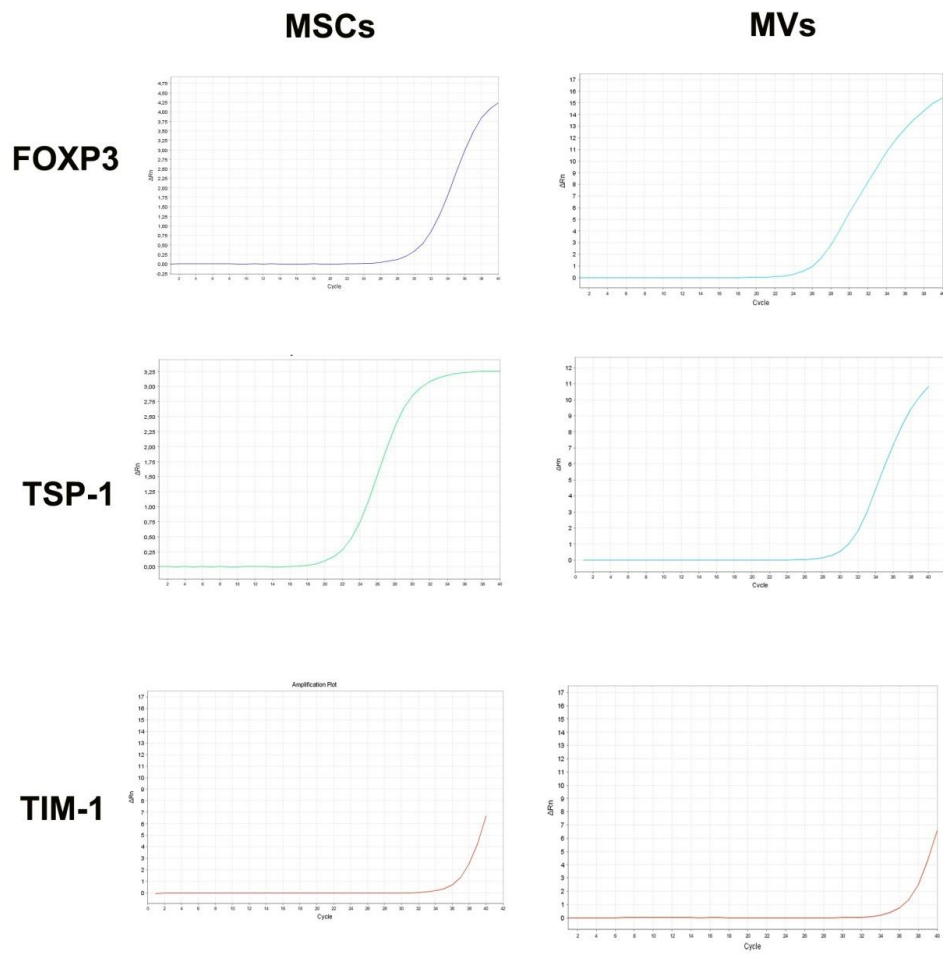


Fig. 38: curve RT-PCR per l'espressione di mRNA di Foxp3, TSP-1 e TIM-1 nelle MSCs e nelle MVs

Internalizzazione delle MVs nei linfociti T e B

Dopo aver caratterizzato le MVs in termini di contenuto proteico e di RNA, è stata investigata la loro capacità di essere internalizzate nei linfociti T e B.

Al fine di valutare la relazione tra la dose di MVs e la percentuale di queste internalizzate nelle cellule, differenti quantità di MVs marcate (10, 50, 100 µg/mL) sono state incubate con i linfociti T e B per 6 ore. La percentuale di internalizzazione aumenta dal 20% (10 µg/mL) per raggiungere il 70% con 100 µg/mL di MVs per i linfociti T (Fig. 39a) e dal 25% (10 µg/mL) fino al 70% con 100 µg/mL di MV per i linfociti B (Fig. 39b).

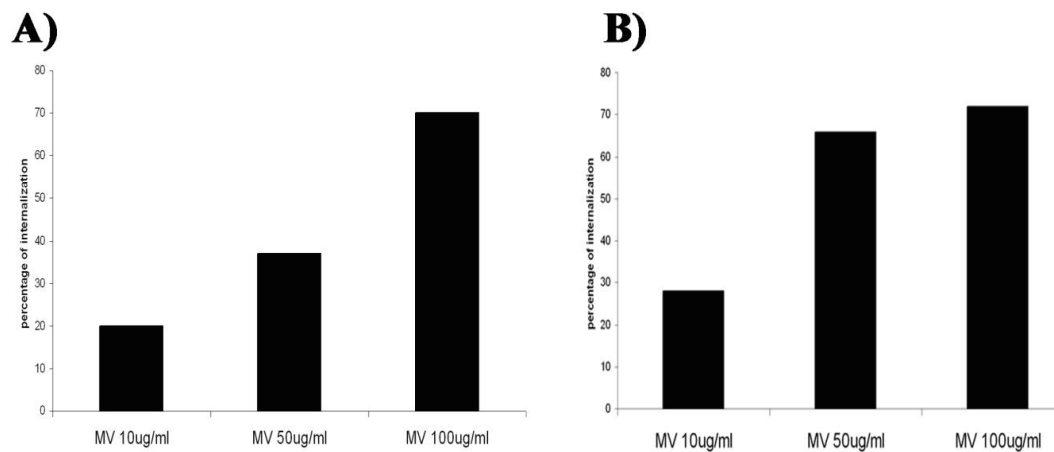


Fig. 39: analisi FACS dell'internalizzazione di MSC-MV nelle cellule T (a) e nelle cellule B (b)

Trasferimento di mRNA di Foxp3 nei linfociti T mediato dalle MVs di MSCs

Per analizzare la capacità delle MVs di trasferire materiale genetico e proteico abbiamo eseguito un'analisi real-time PCR per gli mRNA di Foxp3 sul totale degli RNA estratti dalle cellule T stimulate con una dose di 50 µg/mL di MVs per 24 ore. L'analisi RT-PCR ha dimostrato che le MVs sono capaci di trasferire nelle cellule T l'mRNA di Foxp3. Al contrario quando le cellule T sono stimulate con 50 µg/mL di MVs pre-trattate con RNase, l'RNA di Foxp3 non viene ritrovato. (Fig. 40). Grazie alla capacità delle MVs di trasferire mRNA di Foxp3, le MVs sarebbero in grado di far assumere ai linfociti T il fenotipo T regolatore; è noto che i T_{REG} abbiano una potente attività di inibizione sulla proliferazione delle cellule T e sono considerati importanti mediatori dei meccanismi di immunoregolazione e tolleranza nei trapianti di rene.

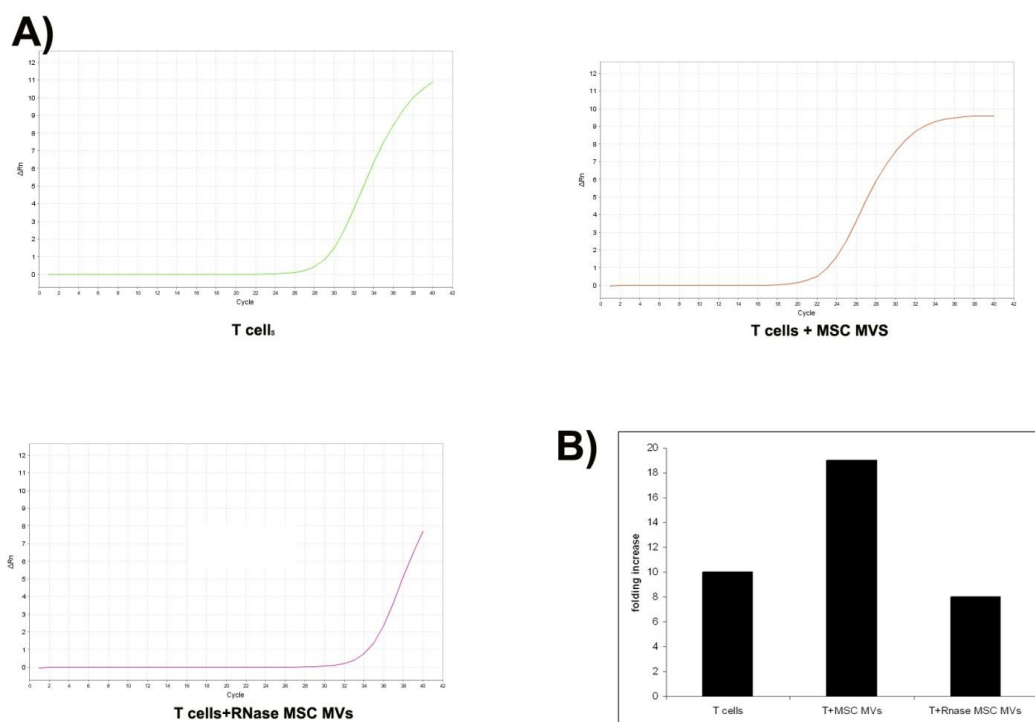


Fig. 40: RT-PCR per l'espressione di mRNA di Foxp3 in linfociti T stimolati con MVs di MSCs (50 µg/ml) o con MVs di MSCs trattate con RNase (50 µg/ml) per 24 ore (a). Quantificazione relativa di mRNA di Foxp3 (b).

Per confermare le analisi eseguite in qRT-PCR abbiamo eseguito l'analisi FACS. A questo scopo abbiamo posto in incubazione le cellule T con una dose pari a 50 $\mu\text{g/mL}$ di MVs o di MVs pre-trattate con RNase per 24 ore e abbiamo osservato l'espressione di Foxp3. L'analisi FACS ha confermato che il trattamento con MVs induce un'aumentata espressione della popolazione T_{REG} rispetto al mancato trattamento con MVs o all'utilizzo di MVs pre-trattate con RNase (Fig. 41)

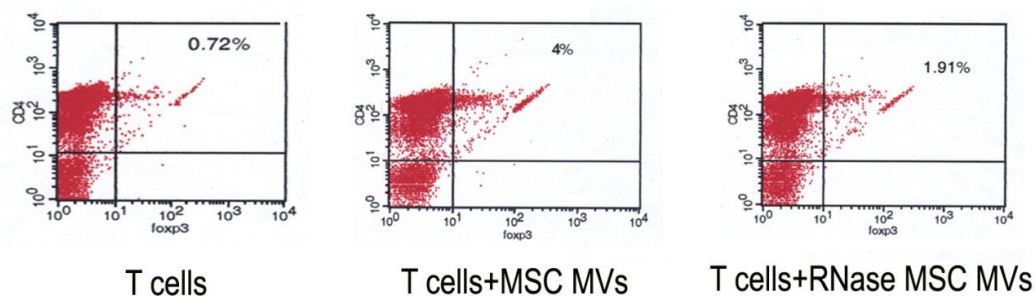


Fig. 41: Analisi FACS analysis dei markers dei Treg nei linfociti T in presenza o assenza di MVs di MSCs pre-trattate o no con 1U/mL di

Co-culture di linfociti T e B

Al fine di studiare i potenziali benefici delle MVs originanti dalle MSCs sul rigetto T cellulo mediato, sono stati isolati linfociti T purificati dal sangue periferico di riceventi di trapianto renale e linfociti B isolati dai rispettivi donatori. Il ruolo delle MVs sulla proliferazione delle cellule T è stato studiato utilizzando un modello *in vitro* di reazione linfocitaria mediata da cellule B derivanti dalla milza di donatori, utilizzate come cellule presentanti l'antigene. A questo scopo abbiamo posto in coltura linfociti T e B in presenza o assenza di 50 $\mu\text{g/mL}$ di MVs delle MSCs pre-trattate o no con 1 U/mL di RNase per 72 ore. Il tasso di proliferazione delle cellule T è stato misurato mediante test BrdU. A confronto con le le co-culture di soli linfociti T e B, la presenza di MVs riduce significativamente il tasso di proliferazione T cellulare per tutte le 23 coppie di donatori-riceventi testate (Fig. 42).

Tale effetto mediato dalle MV risulta ridotto in caso di pre-trattamento delle MVs stesse con RNase, suggerendo dunque un ruolo immunomodulante esercitato dagli RNA trasportati dalle MVs.

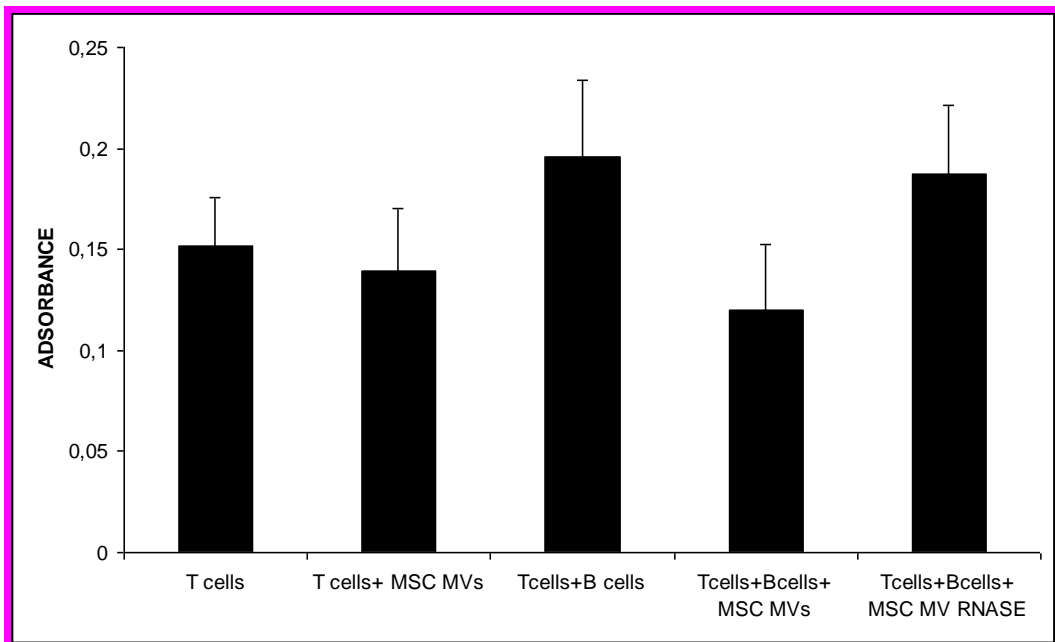


Fig. 42: Analisi BrdU per valutare la proliferazione dei linfociti T. Linfociti T del ricevente e linfociti B del donatore in presenza o assenza di 50µg/ml di MSC MVs pre-trattate o no con RNase.

Come descritto in precedenza, abbiamo ottenuto la trasformazione in linfociti T regolatori, incubando i linfociti T con le MV in grado di trasferire mRNA di Foxp3. Inoltre abbiamo messo a punto un altro modello di co-coltura di cellule B e T (prelevate dalle coppie donatore-ricevente), ponendo tali cellule in coltura con le MVs e stimolando lo shift a fenotipo. L'analisi in BrdU ha messo in evidenza che i T_{REG} ancor più che le MVs inducono significativa riduzione del tasso di proliferazione delle cellule T (Fig. 43).

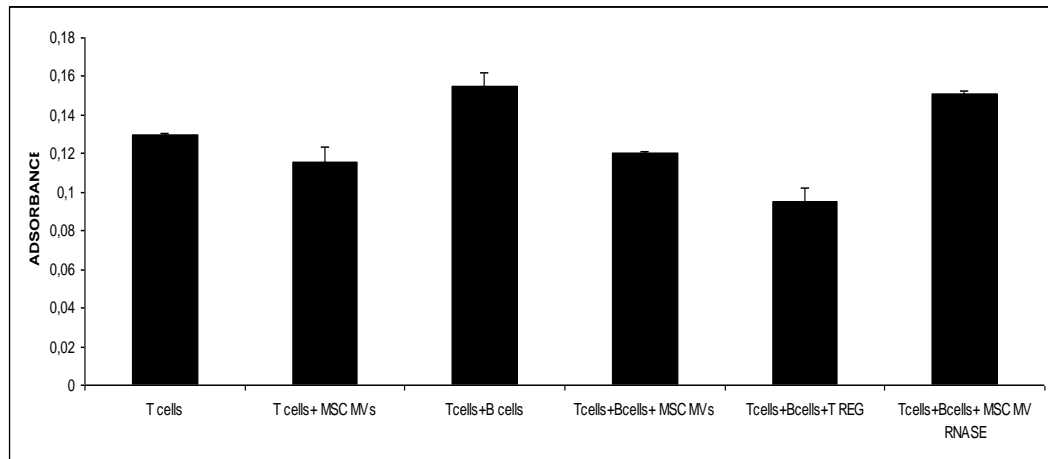


Figure 43: Analisi BrdU per valutare la proliferazione dei linfociti T. Linfociti T del ricevente e linfociti B del donatore in presenza o assenza di 50µg/ml di MSC MVs pre-trattate o no con RNase e in presenza di linfociti T regolatori

Transfer di mRNA di TSP-1 nei linfociti T da parte delle MVs di MSCs

In letteratura è noto che la trombospodina-1 è essenziale per l'induzione dei linfociti T regolatori e la soppressione dei linfociti T circolanti [371].

Per valutare la capacità delle MVs di trasferire la trombospodina-1 nelle cellule T, abbiamo incubato i linfociti T per 24 ore con 50 µg/mL di MVs delle MSCs pre-trattate o no con 1 U/mL di RNase e successivamente abbiamo eseguito un'analisi FACS, che ha dimostrato un aumento di trombospodina-1 nelle cellule T incubate con le MVs. Tale effetto non si osserva se si utilizzano MVs pre-trattate con RNase (Fig. 44).

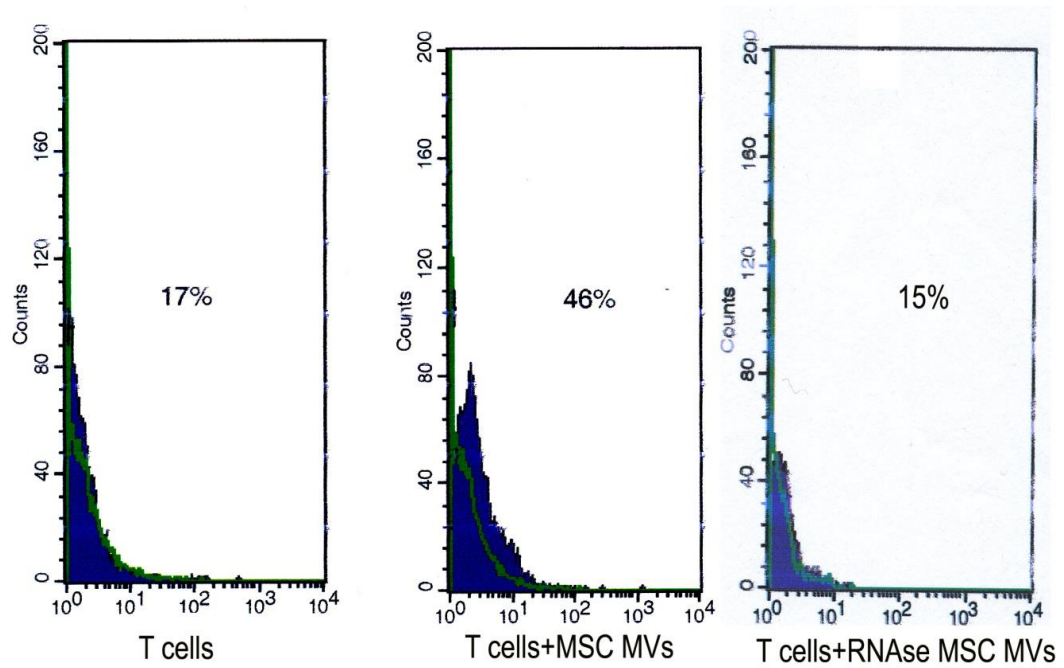


Figure 44: analisi FACS dell'espressione della TSP-1 nelle cellule T stimulate con 50 $\mu\text{g/ml}$ di MSC MVs o con 50 $\mu\text{g/ml}$ di MSCs MV pre-trattate con RNase per 24 ore. Le curve Verdi rappresentano i controlli (cellule T non stimulate)

Parte quinta

DISCUSSIONE

PARTE PRIMA

Nonostante l'evoluzione delle terapie immunosoppressive e le conoscenze in merito al danno immunologico e non immunologico nel trapianto renale, numerose condizioni determinano ancora oggi la perdita funzionale dell'organo trapiantato.

Il rigetto sia acuto che cronico rappresenta una delle cause principali di perdita funzionale del rene trapiantato.

Negli ultimi anni si è progressivamente delineato il ruolo dei linfociti T regolatori nello sviluppo e mantenimento della tolleranza immunitaria. La popolazione dei linfociti T_{REG} svolge un ruolo di controllo attivo sull'immunità e nella prevenzione dell'autoimmunità e del rigetto in ambito di trapianto d'organo o di tessuti.

Di recente è emerso come l'equilibrio tra T effettori e T regolatori sia cruciale al fine di evitare il rigetto dell'organo trapiantato; l'assenza di linfociti regolatori infatti determinerebbe la perdita del trapianto su base immunologica, in una condizione in cui sarebbe stato altrimenti tollerato.

Sebbene si sia ancora lontani dal comprendere pienamente il meccanismo molecolare e cellulare del funzionamento delle cellule T regolatorie, è indubbio che queste possano aprire interessanti prospettive per futuri approcci di immunoterapia e manipolazione in vivo [210].

In condizioni di normalità i T_{REG} circolanti in periferia costituiscono circa il 5-10% del totale delle cellule CD4⁺. In determinate circostanze, i T effettori possono essere indotti ad esprimere Foxp3, mostrando attività regolatrice sia *in vitro* che *in vivo* [211].

E' noto in letteratura che diversi fattori sono in grado di promuovere la tolleranza immunologica proprio intervenendo, direttamente o indirettamente, nel processo di espansione del pool di T_{REG}.

La rapamicina, farmaco immunosoppressore appartenente alla categoria degli mTORi, utilizzato nel trapianto d'organo e in particolare nel trapianto renale, sembrerebbe giocare un ruolo importante in tal senso.

La rapamicina inibisce la proliferazione di molteplici linee cellulari, tra cui i linfociti T. Tuttavia non tutti i linfociti T sono egualmente sensibili all'azione del

farmaco: come è stato inizialmente provato da Battaglia e collaboratori [212], la stimolazione *in vitro* con rapamicina di cellule umane e murine CD4⁺CD25⁺ esita nell'espansione preferenziale delle cellule Foxp3⁺ con funzioni regolatrici. Lo stesso effetto sull'induzione T_{REG} è stato inoltre dimostrato *in vivo*, in modelli di trapianto e di patologie autoimmuni [213]. I T_{REG} risultano dunque resistenti agli mTORi, farmaci in grado di preservarne l'omeostasi e incrementarne il numero tramite la conversione *de novo* di cellule effettrici Foxp3⁻.

È emerso inoltre che così come l'esposizione di lunga durata, anche una breve somministrazione di rapamicina, è sufficiente per alterare il fenotipo e le funzioni dei T_{REG}, con il risultato finale di una migliore capacità di soppressione.

A tale riguardo nella prima parte del nostro progetto ci si è proposti di confermare le osservazioni sopra riportate. Questo è stato possibile sia mediante la caratterizzazione fenotipica e la quantizzazione delle popolazioni di linfociti T e B regolatori nel sangue periferico di pazienti trapiantati di rene in terapia con differenti schemi immunosoppressivi sia tramite esperimenti *in vitro* sui linfociti.

Tre gruppi di pazienti sono stati inclusi nello studio: pazienti in terapia con rapamicina ± tacrolimus ± steroidi, pazienti in terapia con everolimus ± tacrolimus ± steroidi e pazienti in terapia con CNI ± steroidi. La numerosità è risultata essere di 17 nel primo gruppo, 13 nel secondo e 18 nel terzo.

Le analisi citofluorimetriche eseguite sul sangue dei pazienti selezionati hanno evidenziato come la percentuale di T regolatori CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ sia significativamente più elevata nei pazienti in trattamento con rapamicina ed everolimus. Tale dato conferma *in vivo* quanto già noto sul ruolo della rapamicina nell'induzione della conversione dei T effettori verso la linea regolatoria e pone l'attenzione sull'effetto della terapia con everolimus nello stesso ambito.

Nonostante l'everolimus sia un derivato della rapamicina il suo ruolo in tale contesto non era mai stato indagato.

Si può dunque concludere che il trattamento con mTORi permette di espandere il *pool* di linfociti T_{REG} periferici se paragonato a schemi immunosoppressivi con tacrolimus; pur considerando la presenza di un *bias* di fondo, rappresentato dall'eventuale assunzione contemporanea di CNI.

Ciò che risulta di nuovo riscontro e di particolare importanza in ambito di tolleranza è il ruolo degli mTORi nell'induzione dei linfociti B regolatori.

Come emerge dai risultati ottenuti dal nostro gruppo infatti anche la percentuale dei B_{REG} CD19⁺CD27⁺ appare significativamente più elevata nel gruppo in trattamento con mTORi.

Gli mTORi sarebbero dunque in grado di indurre *in vivo* l'espansione della popolazione dei linfociti B_{REG} così come dei T_{REG}, rivestendo una funzione di notevole importanza nel mantenimento della tolleranza immunologica nei confronti del *graft*.

Gli stessi risultati sopra riportati sono stati ottenuti *in vitro* mediante esperimenti eseguiti su cellule linfocitarie T e B stimolate con mTORi e tacrolimus. Le analisi FACS eseguite sui T e B incubati con rapamicina, everolimus e tacrolimus hanno mostrato un notevole incremento della percentuale sia dei linfociti T regolatori che dei B regolatori rispetto al livello basale. La stimolazione con tacrolimus non produce invece alcun cambiamento rispetto al livello basale di espressione, per neussuna delle popolazioni linfocitarie studiate.

Oltre alla rapamicina, è stato riconosciuto un secondo fattore capace di intervenire positivamente nell'espansione del *pool* dei linfociti T regolatori periferici, sul quale ci si è concentrati nella seconda sezione dello studio.

Tale fattore è rappresentato dalla Trombospondina-1 (TSP-1), una proteina di peso molecolare di circa 470 KDa, secreta preferenzialmente da piastrine, cellule APC, leucociti, cellule endoteliali, epiteliali e tumorali.

La TSP-1 è composta da diversi domini strutturali, in grado di interagire in modo specifico con differenti recettori espressi sulla superficie di membrana di molteplici tipi cellulari.

Le innumerevoli interazioni della proteina con linee cellulari diverse spiegano il vasto spettro di funzioni biologiche che ricopre, tra cui si riconoscono una funzione anti-infiammatoria, anti-angiogenetica e immunomodulante.

L'interazione della TSP-1 con i linfociti T produce due effetti diametralmente opposti, di stimolazione o inibizione, a seconda che il recettore interessato sia rappresentato da $\alpha\beta 1$ o dal CD47. Tuttavia la TSP-1 agisce preferenzialmente inibendo la trasduzione mediata dal TCR e la capacità di risposta delle cellule T

naive e adulte alla segnalazione IL-2 dipendente. Il legame con il recettore CD47 inoltre produce l'instaurarsi di uno stato di anergia nelle cellule T effettrici.

L'interazione della TSP-1 con il CD47 presente sulle cellule T attivate CD4⁺CD25⁻, promuove la generazione di linfociti T CD4⁺Foxp3⁺ con funzioni regolatorie.

A supporto di quanto sopra esposto, sono stati eseguiti esperimenti *in vitro* al fine di valutare la differenziazione di cellule T e B stimulate con TSP-1 umana ricombinante (hr-TSP-1). I linfociti T e B sono stati quindi incubati per 48 h con dosi crescenti hr-TSP-1.

I risultati ottenuti mediante citofluorimetria hanno confermato l'aumento della percentuale di espressione dei linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁺, dose-dipendente, rispetto al livello basale.

Di grande interesse è tuttavia l'osservazione che anche il pool di linfociti B regolatori CD19⁺CD27⁺ risulta espanso dopo stimolazione con hrTSP-1, con andamento dose-dipendente.

I nostri dati dimostrano come la TSP-1 sia in grado di incrementare direttamente, presumibilmente tramite il legame con il CD47 linfocitario, non solo la percentuale dei T_{REG} circolanti, ma anche la frazione dei linfociti B regolatori.

Posto che gli mTOR inibitori determinano l'espansione delle popolazioni T_{REG} e B_{REG} e che la TSP-1, in qualità di fattore immunomodulante, esercita il medesimo effetto sulle cellule B e T, si potrebbe ipotizzare che la TSP-1 stessa agisca come mediatore del processo di induzione stimolato dagli mTORi.

L'*end point* principale della prima parte del progetto è stato quello di provare quanto sopra supposto, mediante esperimenti sul sangue dei pazienti in studio ed esperimenti *in vitro* sui linfociti T e B e sulle cellule renali.

La valutazione dell'espressione della TSP-1, mediante saggio ELISA, nel sangue dei pazienti appartenenti ai tre gruppi inclusi nello studio, ha permesso di dimostrare un aumentato livello di produzione della proteina nei pazienti in terapia con rapamicina ed everolimus. Tale dato ha permesso di stabilire l'esistenza di un effetto positivo di stimolazione degli mTORi sulla produzione e sul rilascio nel torrente circolatorio di TSP-1.

Tra le cellule responsabili del rilascio della proteina sono riconosciuti, in letteratura, i leucociti ed in particolare i linfociti T.

Si è reso quindi necessario confermare la produzione di TSP-1 a livello basale nei linfociti T e dimostrarne la presenza nei linfociti B: ciò è stato possibile mediante i risultati ottenuti in RT-PCR e in citofluorimetria su cellule T e B non stimolate.

Successivamente è stata valutata, tramite analisi FACS, la percentuale di espressione della TSP-1 da parte degli stessi linfociti stimolati con rapamicina, everolimus e tacrolimus, in rapporto al livello basale.

I dati ottenuti hanno permesso di evidenziare un incremento notevole della produzione di TSP-1 sia nelle cellule T che nelle cellule B dopo stimolazione con entrambi i farmaci della classe degli mTORi, mentre non è stato osservato alcun cambiamento dopo stimolazione con tacrolimus.

Come ultimo step, si è valutato l'effetto della stimolazione degli mTOR inibitori in presenza di un blocco a livello della via di segnalazione TSP-1/CD47. I linfociti T e B trattati con un anticorpo monoclonale bloccante il recettore CD47 sono stati incubati per 48 h con rapamicina, everolimus e tacrolimus. Successivamente, è stata valutata mediante citofluorimetria la percentuale di espressione delle popolazioni linfocitarie regolatrici.

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile ipotizzare un ruolo di mediazione della TSP-1 nel processo di induzione della conversione dei T e B maturi in T e B regolatori.

È possibile inoltre presumere che la TSP-1 rilasciata dagli stessi linfociti T_{REG} e B_{REG}, sotto lo stimolo degli mTORi, vada ad agire a livello del recettore CD47 espresso sulla superficie di altre cellule T e B effettrici inducendone la conversione verso la linea regolatrice, determinando un automantenimento del processo di espansione.

Come *end point* secondario nella prima parte dello studio si è valutata la differenziazione dei T e B maturi in T e B memoria mediante analisi FACS, nel sangue periferico dei pazienti in studio ed esperimenti *in vitro* sui linfociti.

Le popolazioni di T e B memoria non sembrerebbero essere alterate in alcun modo in seguito a stimolazione con rapamicina ed everolimus. Non sono infatti rilevabili differenze statisticamente significative per quanto riguarda le percentuali

di T e B_{MEM} stimolati con mTORi e le percentuali in condizioni basali. Tale dato risulta essere in contrasto con quanto sostenuto da alcuni studi, secondo cui gli mTORi eserciterebbero un ruolo di induzione delle popolazioni memoria, con effetto dannoso sul mantenimento della tolleranza immunologica.

Le stesse osservazioni sono inoltre valide per quanto riguarda la stimolazione dei linfociti T e B con TSP-1: la percentuale di linfociti T e B memoria, non subisce variazioni significative in seguito a stimolazione con hrTSP-1, rispetto al livello basale di espressione.

I risultati in merito alla differenziazione linfocitaria della linea B in seguito a stimolazione sia con mTORi che TSP-1, rivestono una notevole importanza in un'epoca come quella attuale, di grande interesse nei confronti del rigetto anticorpo-mediato del rene trapiantato. L'aumento in entrambe le condizioni sperimentali della percentuale di B_{REG} e l'assenza di modificazioni per quanto riguarda la percentuale di B_{MEM}, determina infatti uno spostamento dell'equilibrio tra rigetto e tolleranza, verso un situazione di tolleranza immunologica.

Tra le sedi di produzione di TSP-1 sono riconosciute cellule endoteliali ed epiteliali. Nella fattispecie, un lavoro del gruppo di Camussi, pubblicato nel 2006, ha studiato la secrezione della proteina da parte delle cellule tubulari renali in condizioni basali e sotto lo stimolo di differenti farmaci.

Nella terza sezione della prima parte del progetto ci si è concentrati proprio sulla modulazione della produzione della TSP-1 in cellule tubulari ed endoteliali peritubulari renali in diverse condizioni di stimolo.

La percentuale di espressione di TSP-1 nelle TEC e nelle PEC è stata analizzata in citofluorimetria a 24 h dalla stimolazione con rapamicina, everolimus, tacrolimus. Dai risultati ottenuti è emersa la capacità di tali linee cellulari di incrementare la sintesi ed il rilascio della TSP-1, se stimolate con mTORi.

È stato inoltre eseguito saggio ELISA sul surnatante di TEC stimolate con rapamicina, everolimus e tacrolimus. Il livello di espressione di TSP-1 a 48 h dallo stimolo è risultato essere significativamente più elevato per le TEC incubate con rapamicina ed everolimus.

I dati ottenuti costituiscono un'ulteriore prova di quanto ipotizzato in merito al ruolo degli mTORi nel processo di induzione della produzione di TSP-1 nelle

cellule renali. È stata infatti confermata l'ipotesi iniziale secondo cui le cellule renali sia tubulari che endoteliali costituiscono una fonte rilevante di TSP-1.

PARTE SECONDA

Negli ultimi anni si è affermato il potenziale ruolo delle cellule staminali nel trattamento di differenti tipi di malattie degenerative. Vari studi hanno dimostrato l'effetto rigenerativo delle cellule staminali originanti dal midollo osseo, come i progenitori endoteliali (EPCs) e le cellule staminali mesenchimali (MSCs).

Le MSCs hanno determinate caratteristiche immunologiche, in particolare sono scarsamente immunogene e hanno proprietà immunoregolatrici [107]. E' stato osservato che *in vitro* le MSCs aumentano la percentuale di T_{REG} e inibiscono la proliferazione di cellule T memoria [118], rendendole buone candidate a nuovi approcci di immunoterapia, che abbiano come target sia i linfociti T_{REG} che i T memoria.

Sono stati identificati diversi meccanismi coinvolti nella comunicazione cellulare, tra cui la secrezione di fattori di crescita, citochine, recettori di superficie e nucleotidi. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che le cellule comunicano anche attraverso le cosiddette micro-vescicole [138], che per lungo tempo sono state invece considerate scarti cellulari formati in conseguenza di danno cellulare o a seguito del fisiologico turn-over della membrana plasmatica [139]. Quindi per molto tempo non è stato investigato il ruolo effettivo delle MVs, di cui invece è stata evidenziata l'importanza nella comunicazione intercellulare [138, 151]. Le MVs sono rilasciate da differenti tipi cellulari, tra cui le EPCs e le MSCs, esercitando ognuna differenti effetti biologici. Le MVs originanti dalle piastrine attivano l'angiogenesi ed esercitano un'intensa attività pro-coagulante, attraverso l'espressione di specifici fattori di crescita. Le cellule della linea ematopoietica, come i linfociti T e B, i monociti e le cellule dendritiche generano MVs quando esposte a particolari condizioni [151].

Le MVs rappresentano una popolazione eterogenea di vescicole circolari, delimitate da una membrana, con dimensioni incluse tra 80 e 1000 nm. Solitamente le MVs sono generate dal compartimento endosomiale o rilasciate dalla membrana plasmatica di differenti popolazioni cellulari attivate [140]. E' stato di recente osservato che le MVs sono coinvolte in differenti processi

biologici, come la riparazione tissutale mediata dalle cellule staminali [150, 151] o nella progressione tumorale, attraverso il trasferimento di materiale proteico o genico (mRNA o microRNA), suggerendo che le MVs possono giocare un ruolo chiave nella comunicazione intercellulare sia in condizioni fisiologiche (mantenimento dell'omeostasi tissutale) che patologiche [138].

Nella seconda parte di questo studio abbiamo isolato e caratterizzato le MVs di origine dalle MSCs per valutarne le proprietà immunomodulanti nel rigetto T cellulare mediato (TCMR) nel trapianto renale.

Per quanto riguarda la caratterizzazione delle MVs l'analisi in citofluorimetria ha mostrato la presenza di diverse molecole di adesione, note per essere espresse anche sulla membrana delle MSCs, come CD44, CD29, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ integrina e CD73.

L'analisi con gene-array ha mostrato che le MVs contengono diversi mRNA coinvolti nell'immunoregolazione, in particolare abbiamo rilevato la presenza di proteine ed mRNA codificanti per TSP-1, Foxp3 e TIM-1.

Abbiamo osservato che, una volta internalizzate nei linfociti T, le MVs sono in grado di trasferire orizzontalmente l'mRNA di Foxp3, stimolando lo shift verso il fenotipo T regolatore (T_{REG}) e l'mRNA di trombospodina-1, che è essenziale per l'induzione dei linfociti T regolatori e per la soppressione dei linfociti T circolanti.

Per valutare gli effetti biologici delle MVs abbiamo isolato i linfociti T da un gruppo di riceventi di trapianto renale e le cellule B dalle milze dei rispettivi donatori deceduti. Il ruolo inibitore delle MVs sulla proliferazione T cellulare è stato studiato in un modello di reazione linfocitaria, utilizzando i linfociti B provenienti dalla milza dei donatori come cellule presentanti l'antigene. Le MVs favoriscono la riduzione del tasso di cellule T proliferanti per tutte le 23 coppie di donatori-riceventi testate. L'effetto esercitato dalle MVs si riduce se le MVs vengono pre-trattate con RNase, suggerendo un ruolo chiave degli RNA trasportati dalle MVs nel mediare il loro effetto immunomodulante. Inoltre i T_{REG} stimolati dalle MVs riducono il tasso di proliferazione T cellulare.

Le MVs di MSCs inibiscono la proliferazione T cellulare nel TCMR attraverso il trasferimento orizzontale di mRNA di FOXP3 e TSP-1 nelle cellule T. Questi fattori sono essenziali per lo shift dei linfociti T verso il fenotipo regolatore, che è implicato nei fenomeni di tolleranza del trapianto. Alcuni studi hanno evidenziato

un engraftment delle cellule staminali attraverso trans-differenziazione o fusione nell'organo target. Comunque un crescente numero di evidenze suggerisce che la sola localizzazione delle cellule staminali è di per sé sufficiente a favorire la rigenerazione e la ripresa funzionale dei tessuti danneggiati, grazie all'attivazione di meccanismi paracrini, senza che le cellule stesse intervengano direttamente in tali processi. Le MVs agiscono con un meccanismo on/off analogamente ad alcuni meccanismi farmacologici. Queste caratteristiche fanno sì che le MVs rappresentino un'opzione terapeutica più eligibile rispetto all'inoculazione di cellule staminali, che possono anche andare incontro a mal differenziazione e tumorigenesi. L'uso delle MV come strategia terapeutica può essere esteso a malattie caratterizzate da danno endoteliale ad attivazione del sistema immune come il danno ischemia/riperfusiones tipico del trapianto d'organo solido o al rigetto anticorpo mediato.

Conclusioni

I dati ottenuti grazie agli esperimenti eseguiti *in vitro* e sul sangue periferico dei pazienti reclutati nella prima parte di questo lavoro, permettono di provare che: 1) Entrambi i farmaci appartenenti alla classe degli mTORi inducono un aumento della percentuale non esclusivamente dei T_{REG}, ma anche dei B_{REG} circolanti nel sangue periferico; 2) La TSP-1 viene rilasciata a livello basale sia dai linfociti T che dai linfociti B e la stimolazione con mTORi induce un aumento della sua produzione; 3) L'effetto di espansione delle popolazioni T_{REG} e B_{REG} è potenziato sia dalla rapamicina che dall'everolimus e tale effetto è mediato dall'intervento della TSP-1; 4) Gli mTORi non esercitano alcun effetto nel processo di differenziazione verso il fenotipo memoria né per quanto riguarda le cellule T né per quanto riguarda le cellule B; 5) La TSP-1 viene secreta in condizioni di normalità anche da parte di cellule tubulari ed endoteliali peritubulari renali e la sua produzione viene incrementata se stimolate con mTORi.

Alla luce di tali osservazioni è possibile ipotizzare un ruolo diretto degli mTORi, mediato dalla TSP-1, nel mantenimento della tolleranza immunologica nei confronti del rene trapiantato.

La somministrazione di mTORi potrebbe infatti determinare un aumento della secrezione della TSP-1 a livello delle cellule tubulari del rene trapiantato, la quale

a sua volta andrebbe ad agire sui linfociti T e B attivati circolanti, inducendone la conversione verso la linea regolatoria.

L'applicazione al trapianto d'organo, dei risultati ottenuti, se guardiamo al fenomeno tolleranza, consiste nel riconoscere che una dose di mTORi sia favorente la tolleranza più di quanto non lo siano i CNI, per la loro azione nota sui T_{REG} e non nota sui B_{REG} e per la loro azione nulla sulla differenziazione dei T e B maturi verso la linea della memoria.

È possibile infine concludere che la TSP-1, rilasciata da linfociti T e B e da cellule tubulari ed endoteliali peritubulari, rappresenti un mediatore specifico della tolleranza immunologica.

D'altra parte attraverso gli esperimenti sulle MVs originanti dalle MSCs, eseguiti nella seconda parte dello studio, si può ipotizzare che attraverso la trasmissione di fattori di crescita come Foxp3 e di molecole come TSP-1, a cellule target quali i linfociti T del ricevente di trapianto d'organo, le MVs stesse possono favorire lo shift delle cellule CD4⁺ verso un fenotipo regolatore, inibendo o comunque minimizzando la risposta immune potenzialmente esitante nel fenomeno del rigetto del graft.

Le MVs delle MSCs sono in grado di modulare la risposta immunitaria attraverso interazione diretta con le cellule T, contribuendo all'attivazione e regolazione della risposta immune adattativa ed innata e possono avere un ruolo protettivo nel TCMR attraverso l'inibizione della proliferazione T cellulare e la differenziazione verso il fenotipo T_{REG}.

E' peraltro noto in letteratura come le MVs derivanti da MSCs possano giocare un ruolo favorente la riparazione del danno a carico del rene trapiantato in modelli di danno da ischemia/riperfusion. Tale danno, alla base del quale sono riconosciuti meccanismi infiammatori, è uno dei principali responsabili della ritardata ripresa funzionale (DGF), che ha a sua volta un impatto significativo sulla sopravvivenza del graft anche attraverso l'aumento del rischio di sviluppare un rigetto acuto.

Gli approcci che ci si è proposti di studiare potrebbero essere impiegati singolarmente o in combinazione per garantire l'espansione del pool di linfociti

T_{REG}, aspirando al raggiungimento se non della cosiddetta “tolleranza vera” almeno della “quasi tolleranza” che consentirebbe di adottare dei protocolli di “minimizzazione dell’immunosoppressione” che permettano nel contempo di ridurre il carico immunodepressivo, al fine di diminuire gli effetti sfavorevoli dei farmaci sul rene trapiantato e di mantenere sotto controllo la risposta immunitaria senza aumentare il rischio di rigetto d’organo.

L’espansione dei T_{REG} attraverso gli approcci proposti dal presente studio potrebbe essere ottenuta sia *in vivo* direttamente nel ricevente del trapianto d’organo mediante l’utilizzo di mTORi e stimolazione di trombospodina-1 sia attraverso l’infusione di MSCs o di MVs da esse derivate.

Non solo, ma ciascuno degli approcci potrebbe essere applicato *in vitro* stimolando il pool di T_{REG} attraverso un modello analogo a quello proposto per gli esperimenti con le MVs provenienti da MSCs che preveda l’utilizzo di linfociti provenienti dal ricevente (possibilmente prima dell’avvio della terapia immunodepressiva) posti in coltura con linfociti B provenienti dal donatore (ottenuti ad esempio dagli splenociti).

Successive indagini andranno svolte per comprendere dunque se sia più efficace ottenere l’espansione dei T_{REG} *in vitro* o *in vivo*, non solo ma anche per valutare la stabilità dei T_{REG}, il sito, la dose e la frequenza di infusione migliori.

Parte settima

BIBLIOGRAFIA

-
1. **V.S. Gorantla, S.Schneeberger, G. Brandacher, R.Sucher, D. Zhang, A. Lee and X.X. Zheng.** T Regulatory Cells and Transplantation Tolerance. *Transplant Rev.* 2010;24:147–159.
 2. **F.M. Brunet, F. Fenner.** The production of antibodies. 1949. MacMillian, Melburne, 2nd edition
 3. **F.M. Brunet, F. Fenner.** Self and not-self. Melbourne University Press.
 4. **E.C: Guinan, V.A. Boussiotis, D Neuberger.** Transplantation of Anergic Histoincompatible Bone Marrow Allografts. *New Engl J Med.* 1999;304:1704-1714.
 5. **H. Groux , A. O'Garra , M. Bigler, M. Rouleau , S. Antonenko , JE. de Vries , MG. Roncarolo.** A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;309:737-742.
 6. **Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nuñez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB, Turka LA.** Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med.* 1999;5:1303-1307.
 7. **Gershon, R. K. and Kondo, K.** Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.*1970;18:723–737.
 8. **Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. and Masuda.** T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1985;161:72–87.
 9. **Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M.** Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995;155:1151–1164.
 10. **Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. and Sakaguchi, S.** Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 1996; 184:387–396.
 11. **Haas J, Fritzsching B, Trübswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, Vobis D, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B.** Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive

-
- function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*. 2007;179:1322-30.
12. **Bennett C. L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M. E., Ferguson P. J., Whitesell L., et al.** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 2001;27:20–21.
 13. **Zheng Y., Josefowicz S. Z., Kas A., Chu T.T., Gavin M. A. and Rudensky A. Y.** Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007;445, 936–940.
 14. **Ono M., Yaguchi H., Ohkura N., Kitabayashi I., Nagamura Y., Nomura T. et al.** Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 2007;446:685–689.
 15. **Von Boehmer H.** Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 2005;6: 338–344
 16. **Shevach, E. M.** Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30: 636–645.
 17. **Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. and Ono M.** Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133: 775–787.
 18. **Lin W., Haribhai D., Relland L. M., Truong N., Carlson M. R., Williams C. B., and Chatila T. A.** Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* 2007;8:359–368.
 19. **Hill J. A., Feuerer M., Tash K., Haxhinasto S., Perez J., Melamed R., et al.** Foxp3 transcription-factor-dependent and –independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 2007;27:786–800.
 20. **Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K. J., Li L., Marinos N., et al.** Conversion of peripheral CD4+CD25– naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003;198:1875–1886.
 21. **Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K., Olson K., Velinzon K., Inaba K. and Steinman R. M.** Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003;198: 235–247.

-
22. **Fehervari Z. and Sakaguchi S.** Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 2004;16:1769–1780.
 23. **Pasare C. and Medzhitov R.** Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033–1036.
 24. **Veldhoen M., Hocking R. J., Atkins C. J., Locksley R. M. and Stockinger B.** TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179–189.
 25. **Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., et al.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;44: 235–238.
 26. **Li Y., Zhao X., Cheng D., Haga H., Tsuruyama T., Wood K., et al.** The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerance human liver transplant recipients. *Transplantation.* 2008; 86:1837–1843.
 27. **Bluestone JA, Abbas AK.** Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3:253-257.
 28. **H. Waldmann.** Transplantation tolerance-where do we stand? *Nat. Med.* 1999;22:329-341.
 29. **M.J benson, K. Pino-Lagos, M. Rosenblatt and R.J. Noelle.** All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, gut homing in the face of high level of costimulation. *J. Exp. Med.* 2007;204:1765-1774.
 30. **W. Gao et al.** Treg versus Th 17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6. *Cell Cycle.* 2009;8:1444-1450.
 31. **L.M. Francisco et al.** PD-L1 regulates the development, maintenance and function of induced regulatory cell. *J. Exp. Med.* 2009;206:3015-3029.
 32. **M.D. Vu et al.** OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood.* 2007;110:2501-2510.
 33. **J. Wei et al.** Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104:18169-18174.
 34. **S. Haxhinasto, D. Mathis and C. Benoist.** The Akt-mTOR axis regulates the de novo differentiation of CD4+ Foxp3+ cells. *J. Exp. Med.* 2008;205:565-574.

-
35. **G. Lal and J.S. Bromberg.** Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 2009;114:3727-3735.
 36. **I. Wong, D. Mathis, C. Benoist.** TCR-based lineage tracing: no evidence for conversion of conventional into regulatory T cells in response to a natural self-antigen in pancreatic islets. *J. exp. Med.* 2007;204:2039-2045.
 37. **Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, Benedict Cosimi A, Colvin RB.** Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am. J. of Transpl.* 2007; 4:914-922.
 38. **Liu W, Outnam AJ, Xu-yu Z, Szot G, Lee MR, Zhu S, Gottlieb P, Kapranov P, Gingeras T, Fazakas da St. Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA.** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203; 1701-1771.
 39. **Rocandor G, Broen PJ, Maestre L, et al.** Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory cells at single-cell level. *The European Journal of Immunology.* 2005; 35: 1681-1691.
 40. **X. Zhou et al.** Instability of the transcriptional factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2009;10:1000-1007
 41. **Y.Y. wan and R.A. Flavell.** Regulatory T cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007;445:766-770.
 42. **X.O. Yang et al.** Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008;29:44-56.
 43. **J.A. Bluestone, C.R. Mackay, J. O'Shea and B. Stockinger.** The functional plasticity of T cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:811-16.
 44. **L.F. Lu et al.** Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cell by targeting SOCS1 protein. *Immunity.* 2009;30:80-91.
 45. **Lieberman J.** The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:361-370.
 46. **Cao X, et al.** Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007;27:635-646.

-
47. **Zarek PE, et al.** A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 2008;111:251–259.
 48. **Oukka M.** Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann. Rheum. Dis.* 2007;66 (Suppl 3):iii87–iii90.
 49. **Bopp T, et al.** Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 2007;204:1303–1310.
 50. **Fallarino F, et al.** Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4:1206–1212.
 51. **Mellor AL, Munn DH.** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:762–774.
 52. **Cederbom L, Hall H, Ivars F.** CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30:1538–1543.
 53. **Workman CJ, Vignali DAA.** Negative regulation of T cell homeostasis by LAG-3 (CD223). *J. Immunol.* 2004;174:688–695.
 54. **L. Graca, S.P. Cobbold and H. Waldmann.** Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med.* 2002;195:1641-1646.
 55. **N. Zang, et al.** Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 2009;30:458-469.
 56. **D.N. Dittel, T.H. Urbania, C.A. Janeway.** Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice. *J. Autoimmune.* 2000;14:311-8.
 57. **Hu CY, et al.** Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J. Clin. Invest.* 2007;117:3857–3867.
 58. **Shimamura T, Hashimoto K, Sasaki S.** Feedback suppression of the immune response in vivo. II. Involvement of prostaglandins in the generation of suppressor-inducer B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 1982; 69: 192–195.
 59. **Shimamura T, Hashimoto K, Sasaki S.** Feedback suppression of the immune response in vivo. I. Immune B cells induce antigenspecific suppressor T cells. *Cell. Immunol.* 1982; 68: 104–113.

-
60. **Shimamura T, Habu S, Hashimoto K, Sasaki S.** Feedback suppression of the immune response in vivo. III. Lyt-1+ B cells are suppressor-inducer cells. *Cell. Immunol.* 1984; 83: 221–224.
 61. **Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr.** Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 2271–2278.
 62. **DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF.** B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 38–57.
 63. **Mauri C, Blair PA.** Regulatory B cells in autoimmunity: Developments and controversies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010; 6: 636–643.
 64. **Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A.** Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology* 2006;117:548–557.
 65. **Amu S, Strömberg K, Bokarewa M, Tarkowski A, Brisslert M.** CD25-expressing B lymphocytes in rheumatic diseases. *Scand J Immunol.* 2007;65:182–91.
 66. **Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al.** Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117: 530–541.
 67. **Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB.** CD40-dependent and independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1576–1585
 68. **Zheng J, Liu Y, Lau YL, Tu W.** CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 44–50.
 69. **Tu W, Lau YL, Zheng J, et al.** Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood* 2008; 112: 2554–2562.
 70. **Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al.** Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836–1847.

-
71. **Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG.** Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via Foxp3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1114–24
 72. **Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF.** B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008;223:284–299.
 73. **Kuchroo VK, Dardalhon V, Xiao S, Anderson AC.** New roles for TIM family members in immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:577–580.
 74. **Larsen C.P., Austyn J.M. and Morris P.J.** The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized Dorgan allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation. *Ann.Surg.*1990;212:308–315.
 75. **Lombardi G., Barber L., Sidhu S., Batchelor J.R. and Lechler R.I.** The specificity of alloreactive T cells is determined by MHC polymorphisms which contact the T cell receptor and which influence peptide binding. *Int.Immunol.* 1991;3:769–775.
 76. **Merkenschlager M., and Beverley P.C.** Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO(UCHL1). *Int.Immunol.* 1989;1:450–459
 77. **London C.A., Lodge M.P. and Abbas A.K.** Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 2000;164:265–272.
 78. **Marelli-Berg F.M., Hargreaves R.E, Carmichael P., Dorling A., Lombardi G. and Lechler R.I.** Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific non responsiveness in naïve T cells. *J. Exp.Med.* 1996;183:1603–1612.
 79. **Baker R.J., Hernandez-Fuentes M.P., Brookes P.A., Chaudhry A.N., Cook H.T. and Lechler R.I.** Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J. Immunol.* 2001;167:7199–7206.

-
80. **Gokmen M.R., Lombardi G. and Lechler R.I.** The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr.Opin.Immunol.* 2008;20:568–574.
81. **Smyth L.A., Afzali B., Tsang J., Lombardi G. and Lechler R.I.** Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. *Am.J.Transplant.* 2007;7:1442–1449.
82. **Brown K., Sacks S.H. and Wong W.** Coexpression of donor peptide/recipient MHC complex and intact donor MHC: evidence for a link between the direct and indirect pathways. *Am.J.Transplant.* 2011;11:826–831.
83. **R.E Billingham, L. Brent, P.B. Medwar.** Acquired tolerance of skin homografts. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1995;59:409-16.
84. **Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Choti MA, Naji A.** Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science.* 1990;249:1293-1295.
85. **Turvey SE, Hara M, Morris PJ, Wood KJ.** Mechanisms of tolerance induction after intrathymic islet injection: determination of the fate of alloreactive thymocytes. *Transplantation.* 1999;68:30-39.
86. **Sharabi Y, Sachs DH.** Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med.* 1989;169:493-502.
87. **Wood K, Sakaguchi S.** Regulator T cells in Transplantation Tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199- 210.
88. **Kolb HJ.** Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371–4383.
89. **Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin M.I, Mottet C. and Lechler R.I.** In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+ CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007;109:827–835.
90. **Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I. and Lombardi G.** Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci.Transl. Med.* 2011;3,83ra42.
91. **Golshayan D., Wyss J.C., Abulker C.W., Schaefer S.C., Lechler R.I., Lehr H.A. and Pascual M.** Transplantation tolerance induced by regulatory T cells:

-
- in vivo mechanisms and sites of action. *Int. Immunopharmacol.* 2009;9:683–688.
92. **Walker L.S., Chodos A., Eggena M., Dooms H. and Abbas A.K.** Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J. Exp.Med.* 2003;198:249–258.
 93. **Elion GB.** The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture: the pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 1993;685:400-7.
 94. **Sollinger HW.** Mycophenolate Mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996;61:1029-37
 95. **Karin M.** New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998;93:487-90.
 96. **Clipstone NA, Crabtree GR.** Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T lymphocyte activation. *Nature* 1992,357:695-7.
 97. The U.S. Multicenter FK506 liver study Group. A comparison of Tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:1110-5.
 98. **Kahan BD, Rajacopalan PR, Hall M.** Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. *Transplantation* 1999;67:276-84.
 99. **Abraham RT, Wiederrecht GJ.** Immunopharmacology of rapamycin. *Ann Rev Immunol* 1996; 14:483–510.
 100. **Miller JL.** Sirolimus approved with renal transplant indication. *Am J Health Syst Pharm* 56: 2177–2178, 1999.
 101. **Jozwiak J, Jozwiak S, Oldak M.** Molecular activity of sirolimus and its possible application in tuberous sclerosis treatment. *Med Res Rev* 2006;26:160-80.
 102. **Sabatini DM.** m-TOR and cancer: insight into a complex relationship. *NAT REV Cancer* 2006; 6:729-734.
 103. **Goberdhan DC, Boyd CA.** mTOR: dissecting regulation and mechanism of action to understand human disease. *Biochem Soc Trans* 2009; 37:213-6.
 104. **Harris TE, Laurence JC Jr.** TOR signalling. *Sci STKE* 2003; 2003, re15.

-
105. **Yang Q, Guan KL.** Expanding mTOR signaling. *Cell res* 2007;17:666-81.
106. **Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; 14:1296-302.
107. **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM.** Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22: 159, 2006
108. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini, DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098–1101, 2005.
109. **Hresko RC, Mueckler M.** mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280:40406–16.
110. **Franke TF.** Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signaling* 2008; 1: pe29
111. **Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ et al.** Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 2007; 109:3509–12.
112. **Schwartz RH.** T cell anergy. *Ann. Rev. Immunol.* 21: 305–334, 2003.
113. **McMahon G, Weir MR.** The Evolving Role of mTOR Inhibition in Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2011;22: 408–415.
114. **Powell JD, Lerner CG, Schwartz RH.** Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J Immunol* 1999;162:2775–2784.
115. **Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP, Zarek PE, Powell JD** A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* 2007;178:2163–2170.
116. **Colombetti S, Benigni F, Basso V, Mondino A.** Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation. *J Immunol* 2002;169:6178–6186.
117. **Yamamoto T, Hattori M, Yoshida T.** Induction of T-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of T-cell

-
- receptor stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunology* 2007;121: 383–391.
118. **Powell JD, Lerner CG, Schwartz RH.** Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J Immunol* 1999;162:2775–2784.
119. **Vanasek TL, Khoruts A, Zell T, Mueller DL.** Antagonistic roles for CTLA-4 and the mammalian target of rapamycin in the regulation of clonal anergy: Enhanced cell cycle progression promotes recall antigen responsiveness. *J Immunol* 2001;167: 5636–5644.
120. **Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB.** Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999;5: 1298–1302.
121. **Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB.** Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003;19: 503–514.
122. **Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG.** Rapamycin selectively expands CD4 CD25 FoxP3 regulatory T cells. *Blood* 2005;105: 4743–4748.
123. **Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I.** Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4CD25FoxP3 T cells. *Bone Marrow Transplant* 2007;39: 537–545.
124. **Bensinger SJ, Walsh PT, Zhang J, Carroll M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA.** Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4CD25 regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172: 5287–5296.
125. **Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA.** IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3 regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:280–290.
126. **Walsh PT, Buckler JL, Zhang J, Gelman AE, Dalton NM, Taylor DK, Bensinger SJ, Hancock WW, Turka LA.** PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4CD25 Tregs. *J Clin Invest* 2006;116: 2521–2531.

-
127. **Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, Contag CH, Negrin RS.** Inhibition of CD4CD25 regulatory T cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006;108: 390–399.
128. **Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C.** The AKT/mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4 Foxp3⁺ cells. *J Exp Med* 2008; 205: 565–574.
129. **Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL.** Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One* 2009;4: e5994.
130. **White E.** The pims and outs of survival signaling: Role for the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Genes Dev* 2003;17: 1813–1816.
131. **Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB.** The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J Exp Med* 2005;201:259–266.
132. **Basu S, Golovina T, Mikheeva T, June CH, Riley JL.** Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol* 2008;180: 5794–5798.
133. **Steinman RM, Nussenzweig MC.** Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 351–358.
134. **Fu BM, He XS, Yu S, Hu AB, Zhang J, Ma Y, Tam NL, Huang JF.** A tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4CD25 T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice. *Cell Immunol* 2010;261: 69–76.
135. **Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K, Steinman RM.** Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2758–2763.
136. **Hackstein H, Taner T, Logar AJ, Thomson AW.** Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood* 2002;100: 1084–1087.

-
137. **Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW.** Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* 2005;5: 228–236.
138. **Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW.** Rapamycin- conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4 T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3 T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007;178: 7018–7031.
139. **Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, Thomson AW.** Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 2003;101: 4457–4463.
140. **Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW.** Rapamycin- conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4 T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3 T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007;178: 7018–7031.
141. **Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S.** Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 2008;112: 635–643.
142. **Bornstein P.** Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J. Cell Biol.* 1995;130:503–506.
143. **J. Lawler, H. Slayter, and J. E. Coligan.** Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *Journal of Biological Chemistry.* 1978;253:8609–8616.
144. **T.N.Wight, G. Raugi, S.M.Mumby, and P.Bornstein.** Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1985; 33:295–302.
145. **H. Naganuma, H. Satoh, T. Asahara et al.** Quantification of thrombospondin-1 secretion and expression of $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 3 \beta 1$ integrins and

-
- syndecan-1 as cell-surface receptors for thrombospondin-1 in malignant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004;70:309–317.
146. **K. Tan and J. Lawler.** The interaction of thrombospondins with extracellular matrix proteins. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2009;3:177–187.
147. **H. Chen, J. Sottile, D. K. Strickland, and D. F. Mosher.** Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulphate proteoglycans and low-density lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric N-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochemical Journal* 1996;318:959–963.
148. **M. J. Calzada, J. Sipes, H. C. Krutzsch et al.** Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by $\alpha 6\beta 1$ Integrin. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:40679–40687.
149. **J. Lawler and R. Hynes.** The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium binding sites and homologies with several different proteins. *Journal of Cell Biology*. 1986;103:1635–1648.
150. **B. Jimenez, O. Volpert, S. E. Crawford, M. Febbraio, R. L. Silverstein, and N. Bouck.** Signals leading to apoptosis dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature Medicine*. 2000;6:41–48.
151. **A. Majluf-Cruz, J. M. Manns, A. B. Uknis et al.** Residues F16-G33 and A784-N823 within platelet thrombospondin-1 play a major role in binding human neutrophils: evaluation by two novel binding assays. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2000;136:292–302.
152. **P. J. Hogg, D. Owens, T. M. Misenheimer, D. F. Mosher, and C. N. Chesterman.** Thrombospondin is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil elastase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:7139–7146.
153. **B. Margosio, M. Rusnati, K. Bonezzi et al.** Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008; 40:700–709.
154. **M. D. Kosfeld and W. A. Frazier.** Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding

-
- domain of human thrombospondin. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:8808–8814
155. **M. J. Calzada, J. Sipes, H. C. Kruttsch et al.** Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by $\alpha 6\beta 1$ Integrin. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:40679–40687.
156. **G. D. Young and J. Murphy-Ullrich.** The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor- β complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:47633–47642
157. **S. E. Crawford, V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich et al.** Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta 1$ in vivo. *Cell*. 1998; 93: 1159–1170.
158. **S. Schultz-Cherry, F. Chen, D. F. Mosher et al.** Regulation of transforming growth factor- β activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270: 7304–7310
159. **R. L. Silverstein, M. Baird, S. K. Lo, and L. M. Yesner.** Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:16607–16612.
160. **P. Gruarin, R. Thorne, D. J. Dorahy, G. F. Burns, R. Sitia, M. Alessio.** CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;275:446–454.
161. **L. Daviet, E. Malvoisin, T. F. Wild, and J. L. McGregor.** Thrombospondin induces dimerization of membranebound, but not soluble CD36. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997;78:897–901.
162. **Y. Liu, D. Merlin, S. L. Burst, M. M. Pochet, J. L. Madara, and C. A. Parkos.** The role of CD47 in neutrophil transmigration: increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:40156–40166.
163. **D.W. Lawrence, S. B. King, W. A. Frazier, and J.M. Koenig.** Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for

-
- phagocytosis by monocyte-derived macrophages. *Early Human Development*. 2009;85:659–663.
164. **Frazier, W.A., Isenberg, J.S., Kaur, S., Roberts, D.D.** CD47. *Nature Signaling Gateway*. 2010
165. **J. S. Isenberg, L. A. Ridnour, J. Dimitry, W. A. Frazier, D. A. Wink, and D. D. Roberts.** CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:26069–26080
166. **Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J.A., Sessa, W.C.** Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest* 1997.100; 3131–3139
167. **S. M. Kaur, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, S. H. Garfield, J. S. Isenberg, and D. D. Roberts.** Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *Journal of Biological Chemistry*.2010;285:38923–38932.
168. **T.N.Wight, G. Raugi, S.M.Mumby, and P.Bornstein.** Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985; 33:295–302.
169. **P. Grimbert, S. Bouguermouh, N. Baba et al.**Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells-from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *Journal of Immunology*. 2006;177:3534–3541.
170. **V. Doyen, M. Rubio, D. Braun et al.** Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *Journal of Experimental Medicine*.2003;198:1277–1283.
171. **J. S. Isenberg, G. Martin-Manso, J. B. Maxhimer, and D.D. Roberts.** Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin-1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:182–194.
172. **J. S. Isenberg, L. Ridnour, D. D. Thomas, D. A. Wink, D. D. Roberts, and M. G. Espey.** Guanylyl cyclase-dependent chemotaxis of endothelial cells in response to nitric oxide Gradients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40:1028–1033.

-
173. **J. S. Isenberg, W. A. Frazier, and D. D. Roberts.** Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65:728–742.
174. **A. Kaipainen, M. Kieran, S. Huang et al.** PPAR α deficiency in inflammatory cells suppresses tumor growth. *PLoS ONE*. 2007;2, no. 2, article e260.
175. **F. Haviv, M. Bradley, D. M. Kalvin et al.** Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;48:2838–2846.
176. **J. Greenaway, J. Henkin, J. Lawler, R. Moorehead, and J. Petrik.** ABT-510 induces tumor cell apoptosis and inhibits ovarian tumor growth in an orthotopic, syngeneic model of epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8:64–74.
177. **H. Huang, S. C. Campbell, D. F. Bedford et al.** “Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands improve the antitumor efficacy of thrombospondin peptide ABT510. *Molecular Cancer Research*. 2004;2:541–550.
178. **V. Doyen, M. Rubio, D. Braun et al.** Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;8:1277–1283.
179. **H. Torres-Aguilar, R. S. Aguilar-Ruiz, G. Gonz’alez-P’erez et al.** Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4⁺ T cells. *Journal of Immunology*. 2010;184:1765–1775.
180. **D. R. Saban, F. Bock, S. K. Chauhan, S. Masli, and R. Dana.** Thrombospondin-1 derived from APCs regulates their capacity for allosensitization. *Journal of Immunology*. 2010;185:4691–4697.
181. **A. N. Vallejo, L. M’ugge, P. A. Klimiuk, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy.** Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *Journal of Immunology*. 2000;164:2947–2954.

-
182. **S. S.Li, Z.Liu, M. Uzunel, and K. G. Sundqvist.** Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion. *Blood*. 2006;108:3112–3120.
183. **P. Grimbert, S. Bouguermouh, N. Baba et al.** Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells-from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *Journal of Immunology*. 2006;177:3534–3541.
184. **J. S. Savill, I. Dransfield, C. D. Gregory, and C. Haslett.** A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2:965–975.
185. **L. Lamy, A. Foussat, E. J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni, and A. Bernard.** Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *Journal of Immunology*. 2007;178:5930–5939.
186. **A. Azuma, Y. Li, S. Abe et al.** Interferon- β inhibits bleomycin-induced lung fibrosis by decreasing transforming growth factor- β and thrombospondin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005;32:93–98.
187. **B. McGregor, S. Colon, M. Mutin, J. L. McGregor, E. Chignier, and P. Zech.** Thrombospondin in human glomerulopathies: a marker of inflammation and early fibrosis. *American Journal of Pathology*. 1994;144:1281–1287.
188. **C. Daniel, K. Schaub, K. Amann, J. Lawler, and C. Hugo.** Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF- β in experimental diabetic nephropathy in vivo. *Diabetes*. 2007;56:2982–2989.
189. **Li, Z., M. J. Calzada, J. M. Sipes, J. A. Cashel, H. C. Krutzsch, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts.** Interactions of thrombospondins with $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J. Cell Biol*. 2002;157:509–519.
190. **Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, et al.** Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J. Immunol*. 2001;67: 2547–2554.

-
191. **Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati.** CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J. Immunol.* 2000;165: 4624–4631.
192. **Sugita, S., T. F. Ng, P. J. Lucas, R. E. Gress, and J. W. Streilein.** B7+ iris pigment epithelium induce CD8+ T regulatory cells; both suppress CTLA-4+ T cells. *J. Immunol.* 2006;176: 118–127.
193. **Yoshida, M., T. Kezuka, and J. W. Streilein.** 2000. Participation of pigment epithelium of iris and ciliary body in ocular immune privilege, 2: generation of regulatory T cells that suppress bystander T cells via TGF- β . *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 41: 3862–3870.
194. **Yuri Futagami, Sunao Sugita, Jose Vega, Kazuhiro Ishida, Hiroshi Takase, Kazuichi Maruyama, Hiroyuki Aburatani and Manabu Mochizuki.** Role of Thrombospondin-1 in T Cell Response to Ocular Pigment Epithelial Cells. *J Immunol* 2007; 178:6994-7005.
195. **Baboolal, K., G. A. Jones, A. Janezic, D. R. Griffiths, and W. A. Jurewicz.** Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int.* 2002;61: 686–696.
196. **Muthukumar, T., D. Dadhania, R. Ding, C. Snopkowski, R. Naqvi, J. B. Lee, C. Hartono, B. Li, V. K. Sharma, S. V. Seshan, et al.** Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N. Engl. J.* 2005;353:2342–235.
197. **Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati.** Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 1277–1283.
198. **Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig.** Tolerogenic dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 2003;21: 685–711.
199. **Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati.** CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 2000;164: 2193–2199.
200. **B. Bussolati, B. Assenzio, M. C. Deregibus and G. Camussi.** The proangiogenic phenotype of human tumor-derive endothelial cells depends on

-
- thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med.* 2006;84:852–863.
201. **Bonventre, J.V.** Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1993;43:1160–1178.
202. **Sutton, T.A., and Molitoris, B.A.** Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 1998;18:490–497.
203. **Rabb H., Wang Z., Postler G., and Soleimani M.** Possible molecular basis for changes in potassium handling in acute renal failure. *Am. J Kidney Dis.* 2000;35:871–877.
204. **Sheridan, A.M., and Bonventre, J.V.** Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2000;9:427–434.
205. **Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., and Bouck N.** Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.*1994;265:1582–1584.
206. **C.V. Thakar, K. Zahedi, M.P. Revelo, Z. Wang, C. E. Burnham, S. Barone, S. Bevans, A.B. Lentsch, H. Rabb and M. Soleim.** Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *J. Clin. Invest.* 2005;115:3451–3459.
207. **Lieberthal W., Levine JS.** Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. *Am J physiol renal physiol.* 2012;303:180-91.
208. **Zenaida Lopez-Dee, Kenneth Pidcock, and Linda S. Gutierrez.** Review Article: Thrombospondin-1:Multiple Paths to Inflammation. 2011
209. **P. Cravedi, P. Ruggenti and G. Remuzzi.** Sirolimus for calcinuerin inhibitors in organ transplantation: contra. *Kidney International.* 2010;78:1068-1074.
210. **Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ.** CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection:CTLA-4- and IL-10- dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002;168:1080–1086.
211. **Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer.** Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 2005;6: 1219–1227

-
212. **Battaglia, M., A. Stabilini, and M. G. Roncarolo.** Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105: 4743–4748.
213. **Battaglia, M., A. Stabilini, E. Draghici, B. Migliavacca, S. Gregori, E. Bonifacio, and M. G. Roncarolo.** Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells. *Diabetes* 2006;55:1571–1580.
214. **Ruffoni E., Seveso, M., Marson, P., Tison, T. & Cozzi, E.** [Role of antibodies in kidney transplant]. *G. Ital. Nefrol.* 29 Suppl 5, S54–60
215. **Nankivell B. J. & Alexander, S. I.** Rejection of the kidney allograft. *N. Engl. J. Med.* 363, 1451–62 (2010).
216. **Colvin R. B. & Smith, R. N.** Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 807–17 (2005).
217. **Colvin R. B.** Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1046–56 (2007).
218. **Terasaki, P. I.** Humoral theory of transplantation. *Am. J. Transplant* 3, 665–73 (2003).
219. **Dragun D. et al.** Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* 352, 558–69 (2005).
220. **Scornik J. C. et al.** Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction. *Am. J. Transplant* 7, 1808–14 (2007).
221. **Vo A. et al.** Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 359, 242–51 (2008).
222. **Terasaki P. I. & Ozawa M.** Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am. J. Transplant* 4, 438–43 (2004).
223. **Michaels, P. J. et al.** Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J. Heart Lung Transplant.* 22, 58–69 (2003).
224. **Mauiyyedi, S. et al.** Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 574–82 (2001).

-
225. **Regele, H. et al.** Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2371–80 (2002).
226. **Sijkens, Y. W. et al.** Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int.* 65, 2409–18 (2004).
227. **Takemoto, S. K. et al.** National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am. J. Transplant* 4, 1033–41 (2004).
228. **Auchincloss, H. & Sachs, D. H.** Xenogeneic transplantation. *Ann. Rev. Immunol.* 16, 433–70 (1998).
229. **Ménoret, S. et al.** Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation* 77, 1468–71 (2004).
230. **Azimzadeh, A. et al.** Hyperacute lung rejection in the pig-to-human model. 2. Synergy between soluble and membrane complement inhibition. *Xenotransplantation* 10, 120–31 (2003).
231. **Van den Elsen, J. M. H. et al.** X-ray crystal structure of the C4d fragment of human complement component C4. *J. Mol. Biol.* 322, 1103–15 (2002).
232. **Collins, A. B. et al.** Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2208–14 (1999).
233. **Baldwin, W. M., Kasper, E. K., Zachary, A. A., Wasowska, B. A. & Rodriguez, E. R.** Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant* 4, 311–8 (2004).
234. **Sund, S. et al.** Complement activation in early protocol kidney graft biopsies after living-donor transplantation. *Transplantation* 75, 1204–13 (2003).
235. **Saadi, S. & Platt, J. L.** Humoral rejection and endothelial cell activation, 2001. *Xenotransplantation* 9, 239–41 (2002).
236. **Albrecht, E. A. et al.** C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 164, 849–59 (2004).

-
237. **Monsinjon, T. et al.** Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 17, 1003–14 (2003).
238. **Saadi, S., Holzknrecht, R. A., Patte, C. P. & Platt, J. L.** Endothelial cell activation by pore-forming structures: pivotal role for interleukin-1alpha. *Circulation* 101, 1867–73 (2000).
239. **Benzaquen, L. R., Nicholson-Weller, A. & Halperin, J. A.** Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J. Exp. Med.* 179, 985–92 (1994).
240. **Kilgore, K. S. et al.** Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. *Am. J. Pathol.* 150, 2019–31 (1997).
241. **Ikeda, K. et al.** C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 77, 394–8 (1997).
242. **Saadi, S., Holzknrecht, R. A., Patte, C. P., Stern, D. M. & Platt, J. L.** Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J. Exp. Med.* 182, 1807–14 (1995).
243. **Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C. & Fearon, D. T.** C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348–50 (1996).
244. **Qian, Z. et al.** C6 produced by macrophages contributes to cardiac allograft rejection. *Am. J. Pathol.* 155, 1293–302 (1999).
245. **Ota, H. et al.** Terminal complement components mediate release of von Willebrand factor and adhesion of platelets in arteries of allografts. *Transplantation* 79, 276–81 (2005).
246. **Pratt, J. R., Basheer, S. A. & Sacks, S. H.** Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat. Med.* 8, 582–7 (2002).
247. **Smith, J. D., Lawson, C., Yacoub, M. H. & Rose, M. L.** Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int. Immunol.* 12, 563–71 (2000).

-
248. **Jin, Y.-P. et al.** Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *J. Immunol.* 168, 5415–23 (2002).
249. **Rahimi, S. et al.** Non-complement- and complement-activating antibodies synergize to cause rejection of cardiac allografts. *Am. J. Transplant* 4, 326–34 (2004).
250. **Jaramillo, A. et al.** Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome. *Hum. Immunol.* 64, 521–9 (2003).
251. **Yuan, F. et al.** Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. *Transplantation* 78, 766–9 (2004).
252. **Koch, C. A., Khalpey, Z. I. & Platt, J. L.** Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *J. Immunol.* 172, 5143–8 (2004).
253. **Alexandre, G. P. et al.** Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant. Proc.* 19, 4538–42 (1987).
254. **Shishido, S. et al.** ABO-incompatible living-donor kidney transplantation in children. *Transplantation* 72, 1037–42 (2001).
255. **Ogawa, H. et al.** Mouse-heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. II. Transition from accommodation to tolerance. *Transplantation* 77, 366–73 (2004).
256. **Soares, M. P., Brouard, S., Smith, R. N. & Bach, F. H.** Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol. Rev.* 184, 275–85 (2001).
257. **Salama, A. D. et al.** Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am. J. Transplant* 1, 260–9 (2001).
258. **Narayanan, K., Jaramillo, A., Phelan, D. L. & Mohanakumar, T.** Pre-exposure to sub-saturating concentrations of HLA class I antibodies confers resistance to endothelial cells against antibody complement-mediated lysis by regulating Bad through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur. J. Immunol.* 34, 2303–12 (2004).

-
259. **Park, W. D. et al.** Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am. J. Transplant* 3, 952–60 (2003).
260. **Lee, P.-C. et al.** All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74, 1192–4 (2002).
261. **Mason, J. C. et al.** Decay-accelerating factor induction on vascular endothelium by vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via a VEGF receptor-2 (VEGF-R2)- and protein kinase C-alpha/epsilon (PKCalpha/epsilon)-dependent cytoprotective signaling pathway and is i. *J. Biol. Chem.* 279, 41611–8 (2004).
262. **Grubbs, B. C., Benson, B. A. & Dalmaso, A. P.** Characteristics of CD59 up-regulation induced in porcine endothelial cells by alphaGal ligation and its association with protection from complement. *Xenotransplantation* 10, 387–97 (2003).
263. **Sarwal, M. et al.** Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N. Engl. J. Med.* 349, 125–38 (2003).
264. **Williams, J. M. et al.** Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation* 78, 1471–8 (2004).
265. **Hillebrands, J. L. et al.** Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107, 1411–22 (2001).
266. **Koestner, S. C. et al.** Histo-blood group type change of the graft from B to O after ABO mismatched heart transplantation. *Lancet* 363, 1523–5 (2004).
267. **Lagaaij, E. L. et al.** Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357, 33–7 (2001).
268. **Mohiuddin, M. M., Ogawa, H., Yin, D.-P., Shen, J. & Galili, U.** Antibody-mediated accommodation of heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. *Transplantation* 75, 258–62 (2003).
269. **Halloran, P. F.** T cell-mediated rejection of kidney transplants: a personal viewpoint. *Am. J. Transplant* 10, 1126–34 (2010).

-
270. **Adams, A. B. et al.** Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* 111, 1887–95 (2003).
271. **Valujskikh, A. & Lakkis, F. G.** In remembrance of things past: memory T cells and transplant rejection. *Immunol. Rev.* 196, 65–74 (2003).
272. **Jiang, S., Herrera, O. & Lechler, R. I.** New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 550–7 (2004).
273. **Schaerli, P. & Moser, B.** Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol. Res.* 31, 57–74 (2005).
274. **Einecke, G. et al.** The early course of kidney allograft rejection: defining the time when rejection begins. *Am. J. Transplant* 9, 483–93 (2009).
275. **Schenk, A. D., Nozaki, T., Rabant, M., Valujskikh, A. & Fairchild, R. L.** Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients. *Am. J. Transplant* 8, 1652–61 (2008).
276. **Ebert, L. M., Schaerli, P. & Moser, B.** Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* 42, 799–809 (2005).
277. **Kummer, M., Lev, A., Reiter, Y. & Biedermann, B. C.** Vascular endothelial cells have impaired capacity to present immunodominant, antigenic peptides: a mechanism of cell type-specific immune escape. *J. Immunol.* 174, 1947–53 (2005).
278. **Manes, T. D. & Pober, J. S.** Antigen presentation by human microvascular endothelial cells triggers ICAM-1-dependent transendothelial protrusion by, and fractalkine-dependent transendothelial migration of, effector memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 180, 8386–92 (2008).
279. **Xanthou, G., Duchesnes, C. E., Williams, T. J. & Pease, J. E.** CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur. J. Immunol.* 33, 2241–50 (2003).
280. **Famulski, K. S., Sis, B., Billesberger, L. & Halloran, P. F.** Interferon-gamma and donor MHC class I control alternative macrophage activation and activin expression in rejecting kidney allografts: a shift in the Th1-Th2 paradigm. *Am. J. Transplant* 8, 547–56 (2008).

-
281. **Dean, R. A. et al.** Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112, 3455–64 (2008).
282. **Cobbold, S. P. & Waldmann, H.** Regulatory cells and transplantation tolerance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, (2013).
283. **Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J.** How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–32 (2008).
284. **Sakaguchi, S. et al.** Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182, 18–32 (2001).
285. **Xystrakis, E., Boswell, S. E. & Hawrylowicz, C. M.** T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 121–33 (2006).
286. **Belkaid, Y.** Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 875–88 (2007).
287. **Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K. & von Boehmer, H.** Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol. Rev.* 212, 163–9 (2006).
288. **Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–61 (2003).
289. **Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–6 (2003).
290. **Wildin, R. S. et al.** X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20 (2001).
291. **Rudensky, A.** Foxp3 and dominant tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 1645–6 (2005).
292. **Hill, J. A. et al.** Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786–800 (2007).

-
293. **Allan, S. E. et al.** Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19, 345–54 (2007).
294. **Morgan, M. E. et al.** Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 66, 13–20 (2005).
295. **Tran, D. Q., Ramsey, H. & Shevach, E. M.** Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110, 2983–90 (2007).
296. **Vignali, D.** How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur. J. Immunol.* 38, 908–11 (2008).
297. **Quesenberry, P. J. et al.** The stem cell continuum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 228–35 (2005).
298. **Jiang, Y. et al.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–9 (2002).
299. **Reynolds, B. A. & Weiss, S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–10 (1992).
300. **Tropepe, V. et al.** Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287, 2032–6 (2000).
301. **Jackson, K. A., Mi, T. & Goodell, M. A.** Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14482–6 (1999).
302. **Herrera, M. B. et al.** Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24, 2840–50 (2006).
303. **Bussolati, B. et al.** Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am. J. Pathol.* 166, 545–55 (2005).
304. **Orlic, D. & Bodine, D. M.** What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* 84, 3991–4 (1994).
305. **Asahara, T. et al.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–7 (1997).

-
306. **Asahara, T. et al.** Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–8 (1999).
307. **Folkman, J. & Shing, Y.** Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 10931–4 (1992).
308. **Isner, J. M. & Asahara, T.** Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 103, 1231–6 (1999).
309. **Pelosi, E. et al.** Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 100, 3203–8 (2002).
310. **Ingram, D. A., Caplice, N. M. & Yoder, M. C.** Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106, 1525–31 (2005).
311. **Aicher, A. et al.** Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ. Res.* 100, 581–9 (2007).
312. **Timmermans, F. et al.** Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1572–9 (2007).
313. **Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A. & Heibel, R. P.** Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 105, 71–7 (2000).
314. **Ingram, D. A. et al.** Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752–60 (2004).
315. **Sieveking, D. P., Buckle, A., Celermajer, D. S. & Ng, M. K. C.** Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 660–8 (2008).
316. **Urbich, C. et al.** Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 733–42 (2005).

-
317. **Dai, Y. et al.** Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 607–17 (2008).
318. **Jujo, K., Ii, M. & Losordo, D. W.** Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 530–44 (2008).
319. **Miyamoto, Y., Suyama, T., Yashita, T., Akimaru, H. & Kurata, H.** Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 627–35 (2007).
320. **Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V.** Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–36 (2008).
321. **Horwitz, E. M. et al.** Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–5 (2005).
322. **Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B.** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–13 (2006).
323. **Wilson, A. & Trumpp, A.** Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93–106 (2006).
324. **Kiel, M. J. & Morrison, S. J.** Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 290–301 (2008).
325. **Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R.** Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7, 1161–6 (2000).
326. **Zvaifler, N. J. et al.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2, 477–88 (2000).
327. **Zuk, P. A. et al.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–95 (2002).
328. **Williams, J. T., Southerland, S. S., Souza, J., Calcutt, A. F. & Cartledge, R. G.** Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* 65, 22–6 (1999).

-
329. **Campagnoli, C. et al.** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396–402 (2001).
330. **Franquesa, M., Hoogduijn, M. J. & Baan, C. C.** The impact of mesenchymal stem cell therapy in transplant rejection and tolerance. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 17, 355–61 (2012).
331. **Krampera, M. et al.** Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 386–98 (2006).
332. **Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. & Mahon, B. P.** Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 353–63 (2007).
333. **Spaggiari, G. M. et al.** Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–33 (2008).
334. **Ren, G. et al.** Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–50 (2008).
335. **Di Nicola, M. et al.** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–43 (2002).
336. **Selmani, Z. et al.** Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 26, 212–22 (2008).
337. **Djouad, F. et al.** Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25, 2025–32 (2007).
338. **Aggarwal, S. & Pittenger, M. F.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–22 (2005).
339. **Raffaghello, L. et al.** Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26, 151–62 (2008).

-
340. **Almeida-Porada, G., Porada, C. D., Tran, N. & Zanjani, E. D.** Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 95, 3620–7 (2000).
341. **Pereira, R. F. et al.** Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4857–61 (1995).
342. **Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C. & Guinan, E. C.** Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389–97 (2003).
343. **Bartholomew, A. et al.** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 30, 42–8 (2002).
344. **Le Blanc, K. et al.** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439–41 (2004).
345. **Nauta, A. J. et al.** Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114–20 (2006).
346. **Murphy, J. M. et al.** Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 704–13 (2002).
347. **Papadaki, H. A. et al.** Normal bone marrow hematopoietic stem cell reserves and normal stromal cell function support the use of autologous stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 36, 1053–63 (2005).
348. **Kastrinaki, M.-C. et al.** Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 741–9 (2008).
349. **Bacigalupo, A. et al.** T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 33, 819–27 (2005).

-
350. **Arnulf, B. et al.** Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21, 158–63 (2007).
351. **Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ.** Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1487-95
352. **Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ.** Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3791-9
353. **Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J.** Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009 Feb;19(2):43-51. Epub 2009 Jan 12. Review
354. **Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R.** Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004 Jun;34(6):392-401. Review
355. **Johnstone RM.** Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis*. 2006 Mar-Apr;36(2):315-21. Epub 2006 Feb 17. Review.
356. **Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM.** Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Feb;20:22-7. Review.
357. **Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ.** Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):3143-9.
358. **Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM.** Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004 May;11(3):156-64. Review.

-
359. **Lösche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA.** Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*. 2004 Mar;15(2):109-15
360. **Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G.** Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9683-8. Epub 2004 Jun 21.
361. **Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, Ratajczak MZ, Zembala M.** Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Jul;55(7):808-18.
362. **Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ.** Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May;20(5):847-56.
363. **Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G.** Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
364. **Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, Farber DB.** Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*. 2009;4(3):e4722. Epub 2009 Mar 6.
365. **Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Larregina AT, Morelli AE.** Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3081-90.
366. **Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L et al.** Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 2010; 5(7):e11803.
367. **Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM.** Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2060-9.)

-
368. **Bussolati B, Grange C, Bruno S, Buttiglieri S, Deregibus MC, Tei L, Aime S, Camussi G.** Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res* 312: 913–924, 2006
369. **Jindra PT, Zhang X, Mulder A, Claas F, Veale J, Jin YP, Reed EF.** Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration, *Transplantation* 2006, 82:S33-S35
370. **Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G.** Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009 May;20(5):1053-67.
371. **Saban DR, Bock F, Chauhan SK, Masli S, Dana R.** Thrombospondin-1 derived from APCs regulates their capacity for allosensitization. *J. Immunol.* 2010;185:4691-4697
372. **Jianming T, Weuzhen W, Xiumin X, Lianming L et al.** Induction Therapy with autologous mesenchymal stem cells in living related kidney transplants. *JAMA* 2012;307:1169-1177
373. **Perico N, Casiraghi F, Inrona M, Gotti E et al.** Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *J. Immunol.* 2008; 181: 3933-3946