

Indice

INTRODUZIONE	3
• Differenziazione dei linfociti Th17	8
• I linfociti T $\gamma\delta$	16
OBIETTIVO DELLA TESI	27
MATERIALI E METODI	28
• Campioni utilizzati per lo studio	28
• Separazione e colture cellulari.....	29
• Analisi citofluorimetrica ed ELISA.....	30
• Test di fagocitosi e migrazione	31
• Saggio ELISA per la β -defensina.....	32
• PCR real-time quantitativa.....	33
• Analisi statistica.....	33

RISULTATI	34
<ul style="list-style-type: none"> • Fattori che inducono la differenziazione dei linfociti T Vγ9Vδ2 verso la produzione di IL-1734 • Ruolo della stimolazione antigenica e delle citochine nella regolazione dei fattori di trascrizione linea-specifici.....40 • Fenotipo dei linfociti T Vγ9Vδ2 IL-17⁺42 • I linfociti T Vγ9Vδ2 IL-17⁺ inducono la migrazione dei neutrofil e aumentano la loro attività fagocitica: ruolo della chemochina CXCL845 • I linfociti T Vγ9Vδ2 IL-17⁺ up-regolano la produzione di β-defensina da parte dei cellule epiteliali46 • Linfociti T Vγ9Vδ2 IL-17⁺ in pazienti con meningite batterica.....48 	
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA	57

Introduzione

I linfociti T helper CD4⁺ costituiscono un' importante arma di difesa in grado di orchestrare e mobilitare altre tipologie cellulari per agire efficacemente nei confronti degli agenti patogeni. Sulla base del profilo di espressione citochinico è stata inizialmente proposta l'esistenza di distinti subsets di linfociti T helper (classificazione proposta da Mosmann e Coffman, 1989) con specifiche funzioni immunoregolatorie, quali le cellule Th1 e Th2, in grado di mediare rispettivamente la protezione nei confronti di patogeni intra ed extracellulari, ed i linfociti T ad azione regolatoria (Treg), la cui funzione è quella di sopprimere le risposte immunitarie mantenendo la tolleranza al self. I Treg sono a loro volta distinti in linfociti che originano da cellule T CD4⁺ NAIVE, denominati Th3 e Tr1, che producono citochine ad azione inibitoria quali TGF- β e IL10, e linfociti regolatori di origine timica appartenenti all'immunità naturale il cui meccanismo si basa sul rilascio di citochine ad azione inibitoria o sull'inibizione dell'attivazione linfocitaria interferendo sul contatto cellula-cellula, cioè attraverso l'inibizione delle cellule dendritiche che a loro volta non potranno essere più in grado di attivare i linfociti T. Recentemente questo paradigma è stato aggiornato in seguito alla scoperta della famiglia dell'IL-17 che ha permesso l'identificazione di un ulteriore subset di linfociti T CD4⁺, definito Th17 sulla base della produzione dell'omonima citochina (1) (Fig.1). Questi linfociti non producono né IL-4 né INF- γ e la loro differenziazione, a partire dai linfociti T CD4⁺ NAIVE, è inibita proprio dall'azione di queste due citochine, indicando che queste cellule rappresentano una sottopopolazione ben definita e distinta dai classici linfociti Th1 e Th2 (2) (Fig.2).

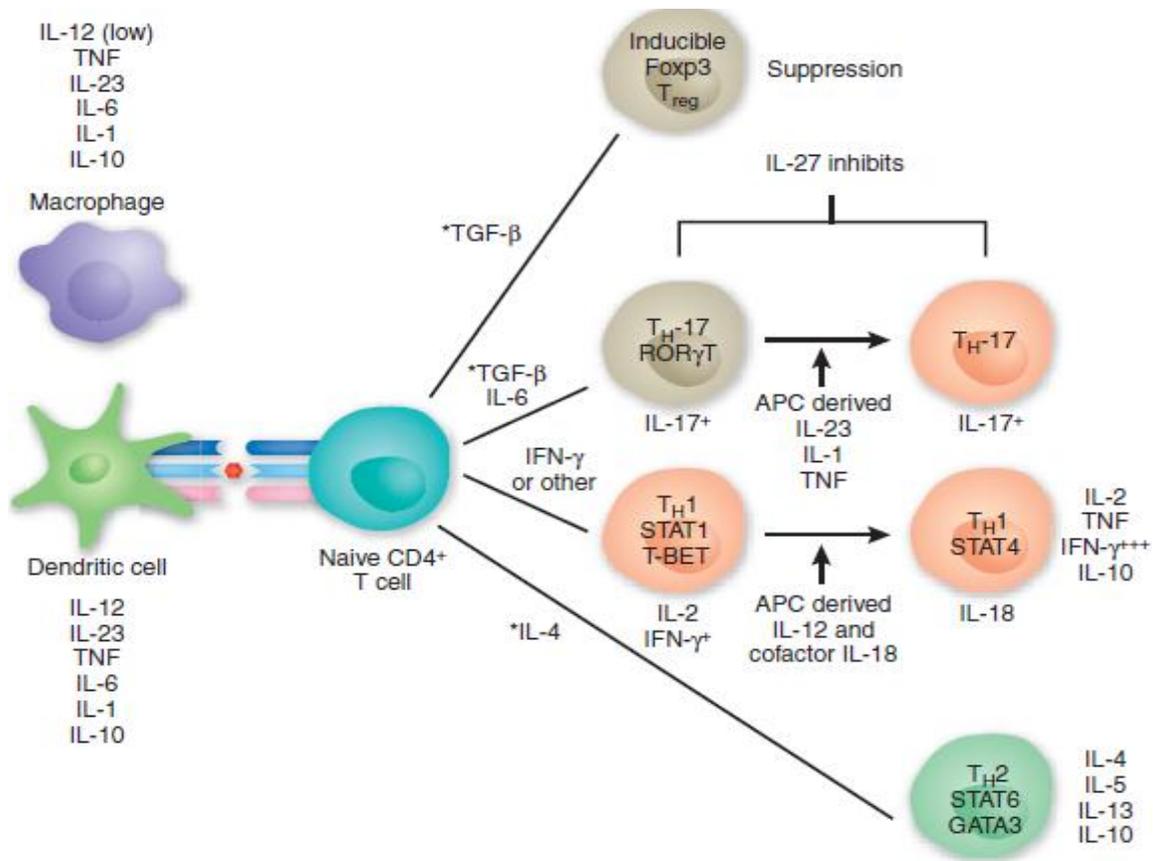


Fig.1 Funzioni effettrici dei vari subsets dei linfociti CD4

Considerando che le cellule Th1 e Th2, come pure le citochine da loro prodotte sono in grado di antagonizzarsi reciprocamente, analogamente lo sviluppo delle cellule Th17 è regolato negativamente dall'IL-4 e dall'INF-γ che sono in grado di inibire l'espansione guidata ad opera dell'IL-23. Oltre al ruolo svolto da parte di queste due citochine, dati recenti indicano che l'inibizione dello sviluppo delle cellule Th17 è determinato anche dall'azione di un'altra citochina, l'IL-27, appartenente alla famiglia dell'IL-12 che, in maniera simile

all'IL-23, viene prodotta dalle cellule dendritiche e dai macrofagi. La famiglia dell'IL-17 (che include 6 membri, l'IL-17A, chiamata anche IL-17, B, C, D, E ed F) comprende citochine proinfiammatorie che possiedono un ampio spettro di funzioni che vanno dal reclutamento

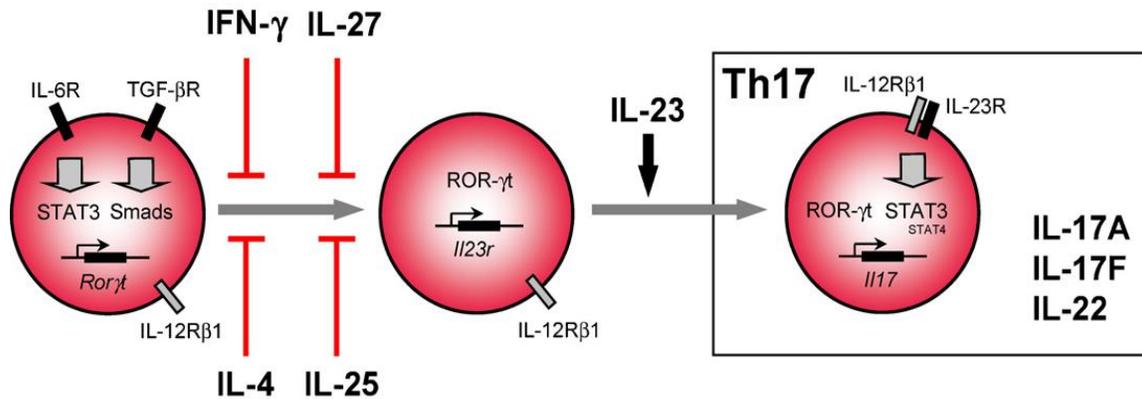


Fig.2 Cross-inibizione del differenziamento Th-17 da parte delle citochine Th-1 e Th2

e attivazione dei neutrofili nei siti di infiammazione, dove svolgono un ruolo chiave nella difesa dell'ospite nei confronti di certe classi di patogeni extracellulari (per esempio Klebsiella, Citrobacter, Borrelia) e infezioni fungine che non vengono efficacemente eliminate da parte dei linfociti Th1 e Th2, all'induzione del riparo e rimodellamento tissutale (3). Mentre altri membri della famiglia dell'IL-17 mappano su differenti cromosomi, l'IL-17A e l'IL-17F sono sintenici sul cromosoma 1, nel topo, e sul cromosoma 6 nell'uomo, e rappresentano le citochine chiave per il reclutamento, l'attivazione e la migrazione dei neutrofili nei tessuti (4). L'interazione tra l'IL-17 e i batteri avviene, inoltre, soprattutto a livello delle superfici mucosali (5). Nel modello più esemplificativo, i batteri extracellulari che invadono

l'ospite innescano l'espressione di IL-23 da parte delle cellule dendritiche attraverso l'interazione con i loro recettori che riconoscono pattern molecolari comuni dei patogeni, come il TLR4, e la produzione di IL-23 induce a sua volta il rilascio di IL-17 da parte delle cellule che esprimono il recettore per l'IL-23 (IL-23R). I membri della famiglia dell'IL-17 svolgono le loro funzioni a seguito del loro legame con i componenti appartenenti alla famiglia recettoriale IL-17R composta da IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Il recettore IL-17RA risulta essere coinvolto nel legame con l'IL-17A e con l'IL-17F (sebbene l'IL-17A presenta una maggiore affinità di legame per lo stesso) e, una volta legata la citochina, subisce un cambiamento conformazionale in grado di indurre la dissociazione dei suoi domini intracellulari (6). l'IL-17 quindi, agendo su un'ampia gamma di tipologie cellulari e tissutali (cellule epiteliali, endoteliali e macrofagi) stimola la produzione di citochine proinfiammatorie come il TNF- α , l'IL1- β , l'IL-6, il GM-CSF e il G-CSF, chemochine, alcune delle quali rappresentate da CXCL1, CXCL8 (o IL8), CXCL10, CCL2 e CCL7 e metalloproteinasi, quali MMP3 e MMP13 (7-9). Tutto ciò comporta come risultato finale il reclutamento dei neutrofili ai tessuti. La maggior parte degli effetti mediati dai linfociti Th-17 sono riconducibili all'IL-17A, la citochina prodotta in maggiore quantità (10). Insieme all'IL-17A essi coproducono IL-17F, che presenta funzioni simili (11), e altre citochine effettrici chiamate IL-21 e IL-22, non esclusive ma preferenzialmente espresse dalla linea Th-17 (12). A differenza dell'IL-17A e IL-17F aventi proprietà proinfiammatorie, L'IL-22, un membro della famiglia citochinica dell'IL-10, sembra esercitare principalmente un'azione protettiva correlata alla produzione di proteine antimicrobiche, chiamate β -defensine, coinvolte nella difesa della barriera epiteliale (13). L'IL-21 invece, un membro della famiglia dell'IL-2, è prodotta principalmente dalle stesse cellule Th-17 che forniscono un segnale di crescita autocrino in grado di amplificare la risposta dei precursori Th-17, e dalle cellule T helper follicolo-

lari che migrano nelle aree B degli organi linfoidi secondari per cooperare con i linfociti B. I linfociti Th17 potrebbero quindi produrre l'IL-21 per comunicare con altre cellule del sistema immune. Questa citochina inoltre, insieme all'IL-7 o all'IL-15, stimola la differenziazione e la proliferazione dei linfociti T CD8⁺ e, prodotta dalle cellule NK ed NK-T, potrebbe indurre la differenziazione delle cellule Th17 in assenza di IL-6 (14) (Fig.3).

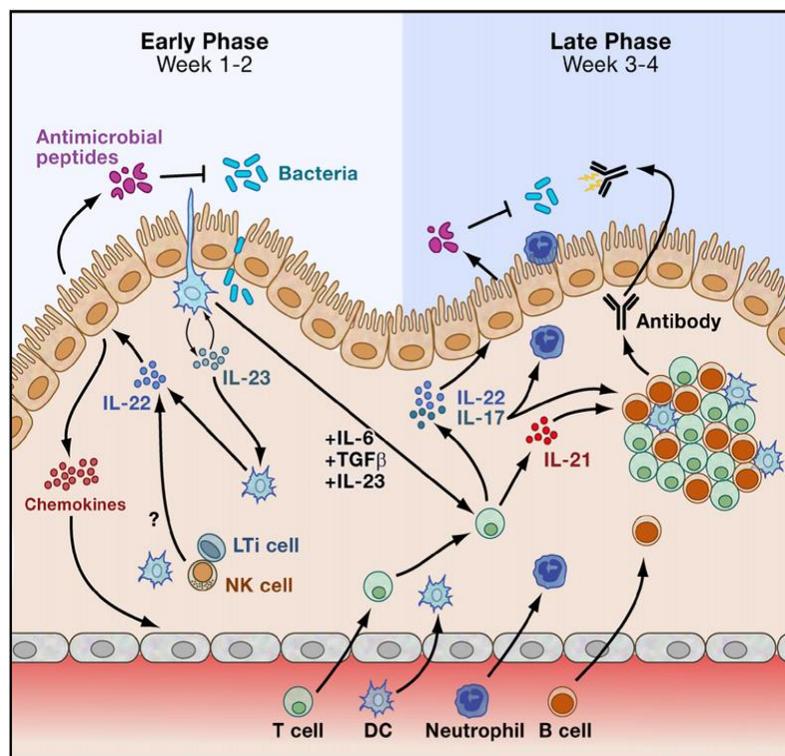


Fig.3 Ruolo dell'IL-17, IL-22 e IL-21 durante le infezioni da parte di microrganismi extracellulari

Oltre a questo ruolo di difesa, la disregolazione della risposta Th-17 è coinvolta nel meccanismo patogenetico di diverse malattie autoimmuni associate a processi infiammatori

cronici e danno tissutale, come l'artrite reumatoide (15, 16), il lupus eritematoso sistemico (17, 18), la psoriasi (19, 20) e la sclerosi multipla (21), in origine esclusivamente attribuite alla disregolazione dei linfociti Th-1. È dunque probabile che ci sia un sequenziale e differente coinvolgimento dei subsets Th-17 e Th-1 durante lo sviluppo delle patologie infiammatorie immuno-dipendenti piuttosto che un ruolo esclusivo di uno di questi due subsets. Le cellule Th17 sembrano infatti essere coinvolte nelle fasi iniziali delle malattie autoimmuni dal momento che sono in grado di accorrere nei siti infiammatori con una rapidissima cinetica e, attraverso una forte induzione mediata dal rilascio di chemochine, potrebbero mobilitare cellule del sistema immune innato, determinando una sorta di ponte di connessione tra l'immunità adattativa e l'immunità innata, e facilitare allo stesso tempo la migrazione di altri subsets di cellule T helper (come i linfociti Th-1) in grado di propagare l'infiammazione e il danno tissutale negli organi bersaglio. La produzione di IL-17 è inoltre caratteristica ma non esclusiva dei linfociti T CD4⁺ αβ. Essa è infatti prodotta anche dai linfociti T non convenzionali, come i linfociti T γδ (22) e le cellule NK-T (23, 24), oltre che dai macrofagi (25) e dai neutrofili (26).

Differenziazione dei linfociti Th17.

Molti autori hanno investigato sui meccanismi coinvolti nella differenziazione dei linfociti Th17, sia nel topo che nell'uomo, a partire da cellule T CD4 αβ naive. Questi studi hanno messo in evidenza che, contrariamente alla differenziazione dei linfociti Th1 e Th2 che risulta essere dipendente dalle rispettive citochine effettrici, l'INF-γ e l'IL-4, la differenziazione delle cellule αβ Th17 non richiede l'intervento dell'IL-17 ma la stimolazione antigene-

specifica delle cellule Th naive in presenza di citochine Th17 polarizzanti prodotte da cellule dendritiche presentanti l'antigene o dalle stesse cellule naive stimolate. In particolare, la differenziazione Th17 si ottiene a partire da cellule Th naive in presenza dell'azione combinata delle citochine IL-1 β , TGF- β , IL-6 (e l'IL-21 autocrina), che inducono l'espressione del recettore per l'IL-23 (IL-23R), del recettore CCR6 e del fattore di trascrizione ROR γ t, specifico per questo subset, la cui induzione è necessaria e sufficiente per la produzione dell'IL-17 (27) (Fig.4).

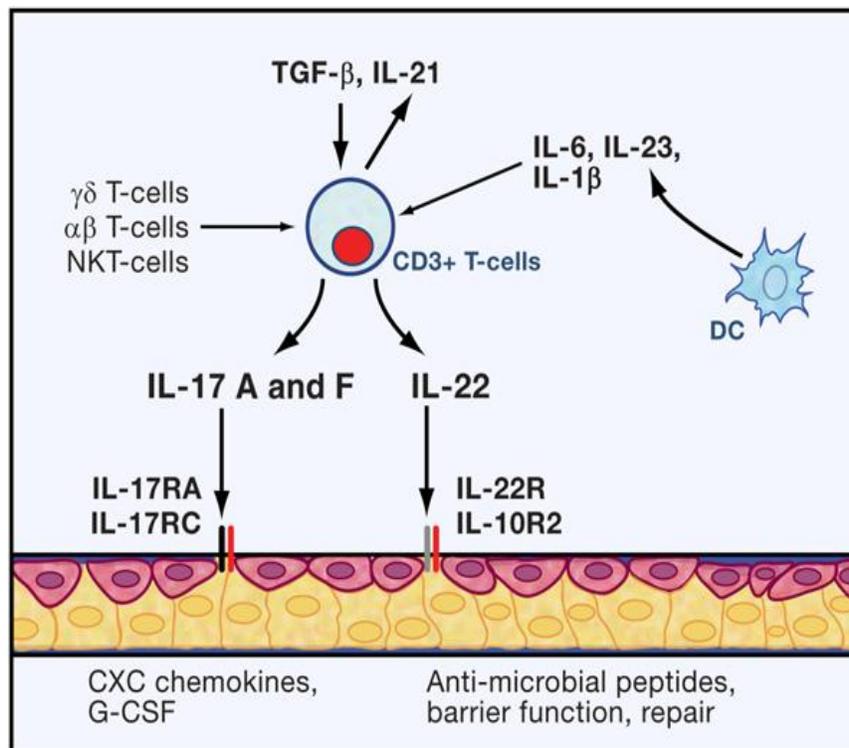


Fig.4 Microambiente citochinico in grado di indurre la produzione di IL-17

La caratterizzazione delle citochine in grado di promuovere la differenziazione del subset Th17 è stato oggetto di intenso dibattito ed, in particolare, il ruolo esplicito del TGF- β . I risultati di studi indipendenti hanno infatti dimostrato la non essenzialità del TGF- β nel determinare la differenziazione della linea Th17 (Acosta Rodriguez, 2007; Wilson et al, 2007; Chen et al. 2007), a differenza di altri studi che hanno invece confermato la sua importanza ma a basse dosi (Volpe et al. Nat. Immunol. 2008; Manel et al. 2008, Veldhoen et al. Immunity 2006; Mangan et al. Nature 2006). Sembra infatti che il TGF- β favorisca la produzione dei linfociti Th-17 o Treg in relazione alla sua concentrazione e alla presenza di altre citochine (28). È stato inoltre osservato che le citochine induttrici del differenziamento Th-17, insieme al TGF- β , sono rappresentate da segnali proinfiammatori non specifici quali l'IL-1, l'IL-6 e l'IL-23, largamente prodotti da monociti e cellule dendritiche come prima linea di difesa dell'organismo durante le infezioni o le infiammazioni locali (Fig. 5).

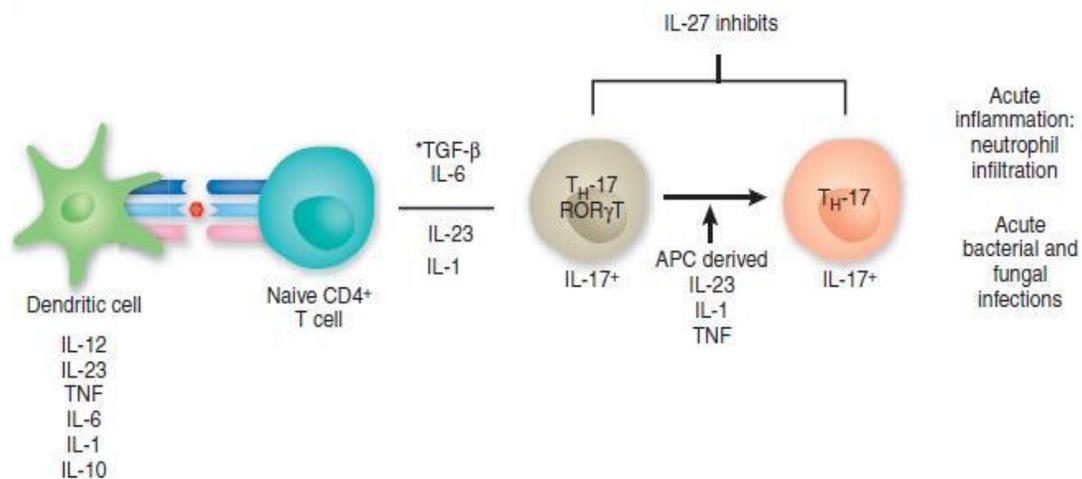


Fig.5 Microambiente citochinico che induce il differenziamento di linfociti CD4 Th17 a partire da cellule CD4 T_{NAIVE}

L'azione di queste citochine sullo sviluppo Th17 determina l'amplificazione della risposta dal momento che uno degli effetti dei linfociti Th17 è quello di indurre la produzione di citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, TNF- α) da parte dei monociti. Il TGF- β è invece considerata una citochina anti-infiammatoria in quanto la sua mancanza è associata ad alcune fatali malattie linfoproliferative (29). Essa rappresenta una citochina regolatoria caratterizzata da funzioni pleiotropiche coinvolte nello sviluppo, omeostasi e tolleranza delle cellule T al self. La partecipazione del TGF- β alla differenziazione dei linfociti Th17 posiziona questa linea in stretta relazione con i linfociti Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dal momento che il TGF- β è coinvolto nello sviluppo di entrambi i subsets. È stato infatti osservato che esiste una certa plasticità nel programma di differenziamento Treg/Th17 regolata dalla concentrazione del TGF- β . Elevate concentrazioni di TGF- β sembrano infatti aumentare i livelli di espressione di Foxp3 shiftando la differenziazione dei linfociti T helper verso le cellule Treg, mentre la presenza del TGF- β a basse concentrazioni, e in presenza di altre citochine, promuove la generazione dei linfociti Th17. L'assenza del TGF- β , infine, induce uno shift da un profilo Th17 verso un profilo Th-1 like. Il TGF- β a basse dosi sembra infatti favorire in maniera indiretta lo sviluppo dei linfociti Th17, tramite la selettiva inibizione del fattore di trascrizione T-bet (implicato nello sviluppo dei linfociti Th-1), più che con modalità diretta (Fig.6).

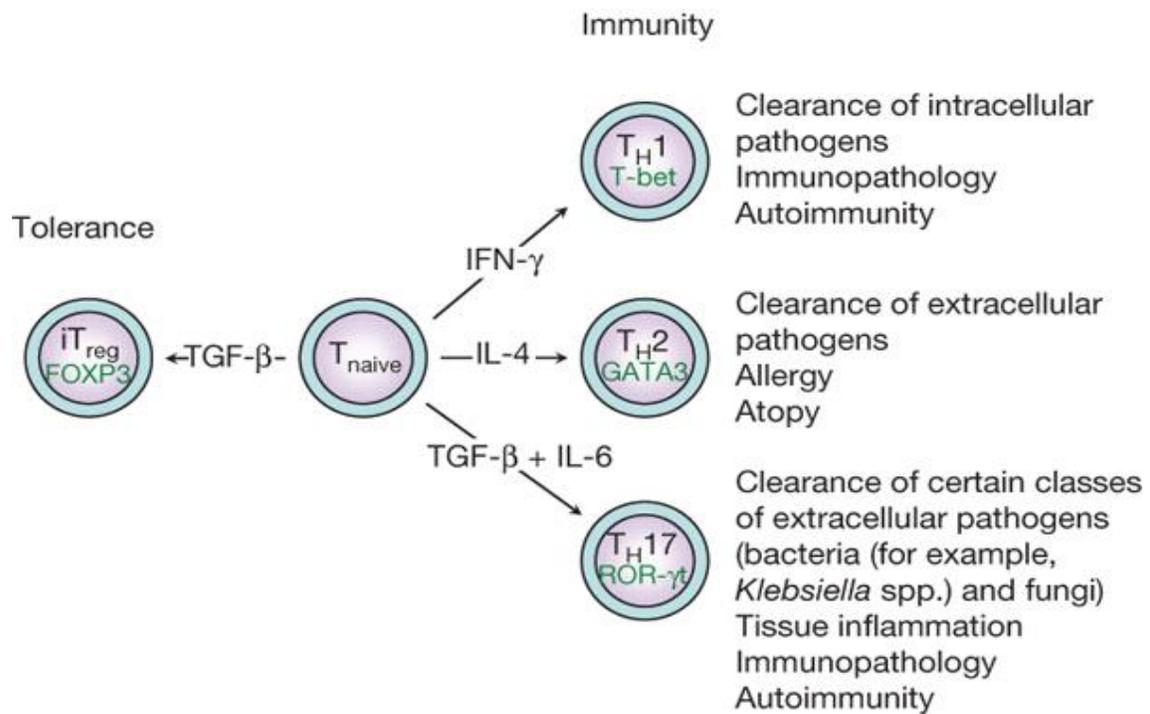


Fig.6 Relazione tra i vari subsets T helper in relazione all'ambiente citochinico

Inoltre, le citochine in grado di promuovere lo sviluppo delle cellule Th17 agiscono in momenti differenti del pathway differenziativo che risulta costituito da tre differenti steps (Fig.7):

- **induzione** iniziale del differenziamento controllato ad opera dell'IL-6 e del TGF- β , con l'IL-1 che amplifica questo processo;
- **amplificazione** guidata dalla produzione di IL-21 prodotta dalle stesse cellule Th17;
- **stabilizzazione/mantenimento** del fenotipo delle cellule già differenziate regolati dall'azione dell'IL-23.

Mentre la combinazione del TGF- β e dell'IL-6 induce la produzione di considerevoli quantità di IL-17A e IL-17F da parte delle cellule Th17, la sintesi di concentrazioni apprezzabili di IL-22 richiede *in vitro* l'aggiunta di IL-23. L'IL-22 potrebbe quindi rappresentare una citochina effettrice finale prodotta dai linfociti Th17 terminalmente differenziati (30).

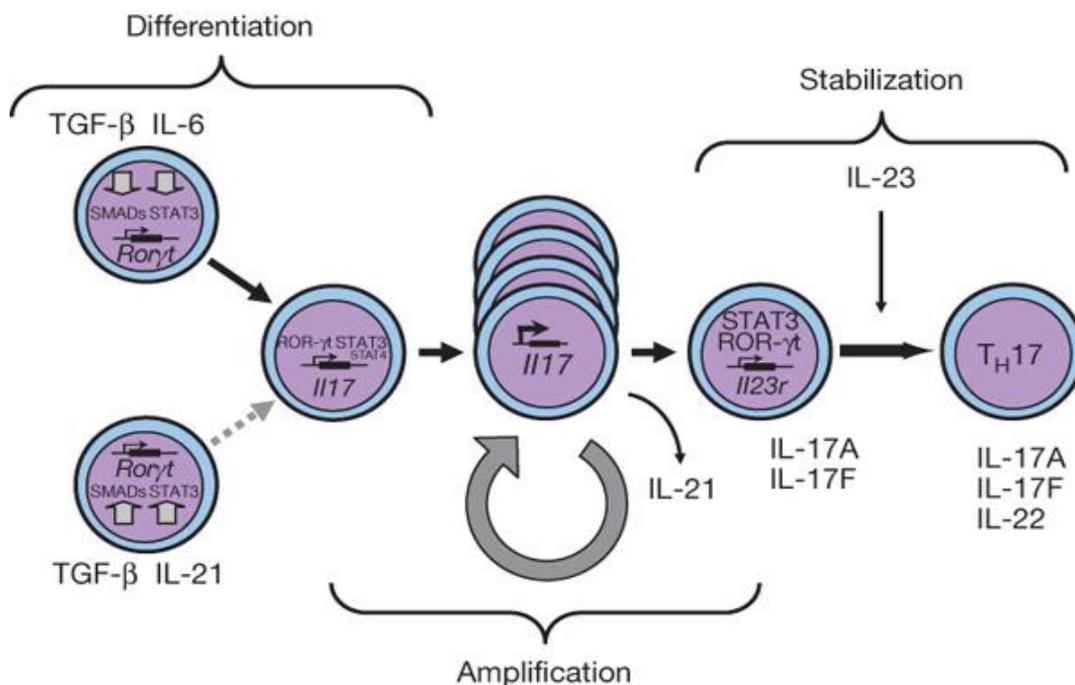


Fig.7 Fasi del processo di differenziamento Th17

Tali studi per la generazione di cellule Th17 sono stati condotti su cellule T_{NAIVE} ($CD45RA^+$ $CD27^+$). Essendo infatti gli essere umani continuamente esposti ad una grande varietà di agenti patogeni è necessario isolare dai linfociti T $CD4^+$ le cellule T_{NAIVE} prima di poterne studiare la successiva differenziazione verso le cellule Th17. Infatti, la presenza di linfociti

T attivati, che producono altre citochine, potrebbe influenzare lo sviluppo della linea Th17, rappresentando quindi un ostacolo per la comprensione di questo processo. È quindi fondamentale ottenere una popolazione altamente purificata di cellule T_{NAIVE} umane, al fine di ottimizzare la stimolazione su una popolazione che non ha subito l'influenza di cellule già differenziate.

Dal punto di vista molecolare la piena differenziazione Th17 è inoltre modulata dall'attivazione del recettore arilico (aryl hydrocarbon receptor, AhR), un fattore di trascrizione ligando-dipendente che risponde ad una vasta gamma di metaboliti, alcuni dei quali presenti in maggiore concentrazione in alcuni tipi di terreni utilizzati per le colture cellulari (31). E' stato infatti osservato che, per esempio, esistono sostanziali differenze riguardo la presenza di ligandi endogeni per l'AhR tra l'RPML, il più comune terreno di coltura utilizzato in laboratorio per le colture linfocitarie, e l'IMDM (Iscoe's modified Dulbecco's medium), contenente concentrazioni da tre a cinque volte più elevate di aminoacidi aromatici (triptofano, tirosina, fenilalanina), metaboliti riconosciuti dall'AhR. Probabilmente, proprio per questa diversa composizione e quindi distinta capacità di attivare il recettore arilico, il terreno IMDM è in grado di supportare un'espansione più elevata di linfociti Th17 sia nel topo che nell'uomo. L'AhR, ampiamente espresso in molti tessuti e tipologie cellulari, come polmoni, fegato, placenta, cuore, timo e cellule del sistema immune, è stato inizialmente identificato come recettore per una vasta gamma di ligandi come diossine e altre tossine ambientali, metaboliti del triptofano, alcuni composti presenti in alimenti come i flavonoidi e proteine virali. In seguito ad attivazione tramite legame con le molecole riconosciute, l'AhR trasloca nel nucleo e controlla la trascrizione dei suoi geni target. Tra questi, uno dei più studiati è la famiglia del gene CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1) che codifica per la

famiglia del citocromo P450, enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, suggerendo importanti e diversi ruoli fisiologici di questo recettore. Attualmente la comprensione del meccanismo che sta alla base dell'interazione dell'AhR con il programma Th17 non è completamente noto ma è plausibile che l'AhR interagisca con altri fattori di trascrizione in grado di modulare la differenziazione Th17.

Un altro importante fattore di trascrizione che guida la differenziazione dei linfociti umani Th17 è il recettore nucleare orfano per l'acido retinoico RORC2 (retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C). E' stato attualmente dimostrato che non esiste una diretta interazione tra l'AhR e il fattore di trascrizione RORC2 ma sembra che l'AhR interagisca con altri fattori di trascrizione in grado di influenzare positivamente o negativamente la differenziazione Th17.

Dal punto di vista fenotipico, un altro strumento utile per delineare il profilo Th17 è la caratteristica espressione sulla superficie cellulare dei recettori per chemochine. E' stato infatti osservato che le cellule del sangue periferico CCR6⁺ CXCR3⁻ sono principalmente linfociti Th17 ed in minima parte linfociti Th17/Th1, tutti i linfociti CCR6⁻ CXCR3⁺ sono invece cellule Th1 ed infine la frazione di cellule CCR6⁺ CXCR3⁺ circolanti contiene i subsets Th17, Th17/Th1 e Th1. Questo aspetto potrebbe suggerire una comune origine evolutiva tra le cellule Th17 e le cellule Th1, supportato anche dal fatto che cloni Th17 umani, messi in coltura in presenza di IL-12, vengono indotti a produrre IFN- γ (32).

I Linfociti T $\gamma\delta$.

Sebbene molti studi abbiano focalizzato l'attenzione sulla differenziazione dei linfociti T CD4⁺, conducendo ad una conoscenza più approfondita di queste cellule, nel topo i linfociti T $\gamma\delta$ rappresentano una sorgente innata di IL-17 che precede lo sviluppo della risposta adattativa CD4 Th17 e, in alcune circostanze, addirittura più rilevante di quella proveniente dai linfociti T CD4⁺. Per esempio, durante l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) i linfociti T $\gamma\delta$ provenienti dai polmoni sono la principale fonte di IL-17. Situazione analoga si presenta in seguito all'infezione da *Escherichia Coli* (*E. Coli*), nel corso della quale i linfociti T $\gamma\delta$ sono i principali produttori di IL-17 e, in seguito a deplezione anticorpale di queste cellule, si verifica una minore produzione di IL-17 e una ridotta infiltrazione di neutrofili nella cavità peritoneale (33). Nell'infezione epatica sostenuta da *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) l'IL-17 prodotta dai linfociti T $\gamma\delta$ gioca un ruolo determinante nel conferire protezione durante la fase precoce dell'infezione, contribuendo ad aumentare l'attività battericida di cellule non fagocitiche infettate dal microrganismo attraverso l'induzione, nel topo, del gene che codifica per il peptide antimicrobico β -defensina. Questi risultati indicano che il meccanismo protettivo IL-17-dipendente dei linfociti T $\gamma\delta$, di recente identificazione, agisce nel topo nei confronti di infezioni causate da batteri intracellulari ma, nonostante diverse evidenze sperimentali suggeriscano che l'IL-17 prodotta dai linfociti T $\gamma\delta$ rappresenta la sorgente più precoce in grado di produrre questa citochina in seguito all'infezione, rimangono ancora da chiarire molti degli aspetti fenotipici e funzionali di queste cellule così come le condizioni sperimentali che nell'uomo guidano la loro polarizzazione funzionale.

Nell'ambito della difesa immunitaria i linfociti $T\gamma\delta$ giocano un ruolo molto importante insieme ad altre cellule del sistema immune innato, come le natural killer, e costituiscono una popolazione cellulare caratterizzata da una distribuzione e da funzioni rimaste per molto tempo un enigma che solo adesso sta iniziando ad essere risolto. Per esempio, nel topo la natura dei ligandi riconosciuti dai linfociti $T\gamma\delta$ rimane ancora in gran parte sconosciuta sebbene risulti evidente che queste cellule rispondono ad un'ampia varietà di prodotti microbici e cellule epiteliali stressate (34). La maggior parte dei linfociti $T\gamma\delta$ circolanti nel sangue periferico umano esprimono invece un recettore TCR rappresentato dalle catene $V\gamma9$ e $V\delta2$ in grado di riconoscere metaboliti non peptidici fosforilati derivati dalla biosintesi degli isoprenoidi, come l'HMBPP [(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate], l'IPP (Isopentenyl pyrophosphate) e il DMAPP (Dimethylallyl pyrophosphate), espressi da diversi tipi di microrganismi e cellule trasformate (35-40). L'attivazione dei linfociti $T V\gamma9V\delta2$ in seguito al riconoscimento di questi ligandi comporta il rilascio di molecole regolatorie/immunomodulatorie in grado di influenzare il reclutamento e la funzione di altre cellule chiave del sistema immune, come la maturazione delle cellule dendritiche (41), l'attivazione dei linfociti B (42) e la polarizzazione dell'immunità adattativa verso una risposta di tipo Th1 (43). Recentemente, alcune evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato un nuovo impatto di questo subset cellulare sulla presentazione dell'antigene attraverso un cross-talk che prevede l'intervento delle cellule dendritiche. Una tale plasticità enfatizza quindi la capacità dei linfociti $T V\gamma9V\delta2$ di influenzare la natura della risposta immune. Le cellule $T\gamma\delta$, inoltre, vengono prodotte nel timo e da tale sede si distribuiscono nel circolo ematico e nei linfonodi da dove, una volta arrivati, potranno raggiungere i siti infiammatori. Nell'uomo, la maggior parte dei linfociti T maturi circolanti esprime recettori di tipo $\alpha\beta$ men-

tre, in condizioni normali, la percentuale di linfociti T che esprime un recettore di tipo $\gamma\delta$ è molto bassa (1-5% del sangue periferico) (44). Queste cellule sono scarsamente rappresentate nel sangue periferico al momento della nascita ma il loro numero aumenta con l'età fino a raggiungere un picco a 7 anni. Poiché questo fenomeno avviene indipendentemente dal timo è stato ipotizzato un processo di espansione periferica antigene-dipendente (45). In accordo con tale ipotesi i linfociti $T\gamma\delta 1$ predominano in epoca fetale e durante l'infanzia, mentre le cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ rappresentano il maggior subset cellulare presente a livello del sangue periferico umano adulto costituendo circa l'80-90% dell'intero pool di cellule $T\gamma\delta$. Le cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ cordonali esprimono il fenotipo CD45RA naive mentre la maggiore parte di cellule adulte esprime il fenotipo di memoria CD45RO (46). Il TCR $\gamma\delta$ è un recettore di tipo eterodimerico associato, allo stesso modo del TCR $\alpha\beta$, alle proteine CD3 e ξ le quali fungono da cinghia di trasmissione tra il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR e gli eventi biochimici che portano all'attivazione dei linfociti T. Il fatto che le cellule $T\gamma\delta$ possano down regolare la risposta infiammatoria mediata dalle cellule Th1, può suggerire che queste cellule possano giocare un ruolo regolatorio durante l'infezione. Nell'uomo, numerosi studi hanno messo in evidenza *in vitro* la reattività sia dei linfociti $V\delta 2$ che dei linfociti $V\delta 1$ contro cellule tumorali e cellule infettate da virus, parassiti e batteri (47). Una diretta implicazione di queste cellule è stata messa in evidenza anche *in vivo*. I linfociti $T\gamma\delta$ presentano un importante ruolo nella risposta anti-tumorale oltre che nella risposta alle infezioni causate soprattutto da batteri intracellulari e virus. Nel corso di alcune infezioni umane, le risposte da parte delle cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ al *Mycobacterium tuberculosis (MTB)* sono state descritte già nel 1989 (48). Anni dopo, una serie di studi descrissero la spiccata espansione di questo subset cellulare nel sangue di pazienti affetti da

Tubercolosi (TB), ma anche in una serie di altre infezioni come la lebbra, la malaria, la salmonella, lo *Streptococcus Pneumoniae*, etc. Durante le infezioni virali, le cellule T $\gamma\delta$ potrebbero esercitare la loro attività attraverso un meccanismo diretto di citotossicità cellulare e tramite un meccanismo di tipo indiretto inducendo la modulazione di altri subsets cellulari del sistema immunitario. La risposta a questa varietà di agenti infettivi è, come accennato prima, il risultato del riconoscimento di componenti non peptidici come l'isopentil pirofosfato (IPP) o altri composti intermedi del pathway del mevalonato (49). Infatti, i linfociti T $\gamma\delta$ sono attivati direttamente in modo TCR-dipendente da ligandi non peptidici a basso peso molecolare (inferiori a 500 Da) e tali ligandi, detti fosfoantigeni, comprendono fosfoesteri naturali derivati da micobatteri e parecchi metaboliti ubiquitari come alchilamine estratte da piante, xilosio- e ribosio-1-fosfato, 2-3 difosfoglicerato e diversi amminobifosfonati sintetici che non necessitano della modalità di presentazione MHC-ristretta (Fig.8).

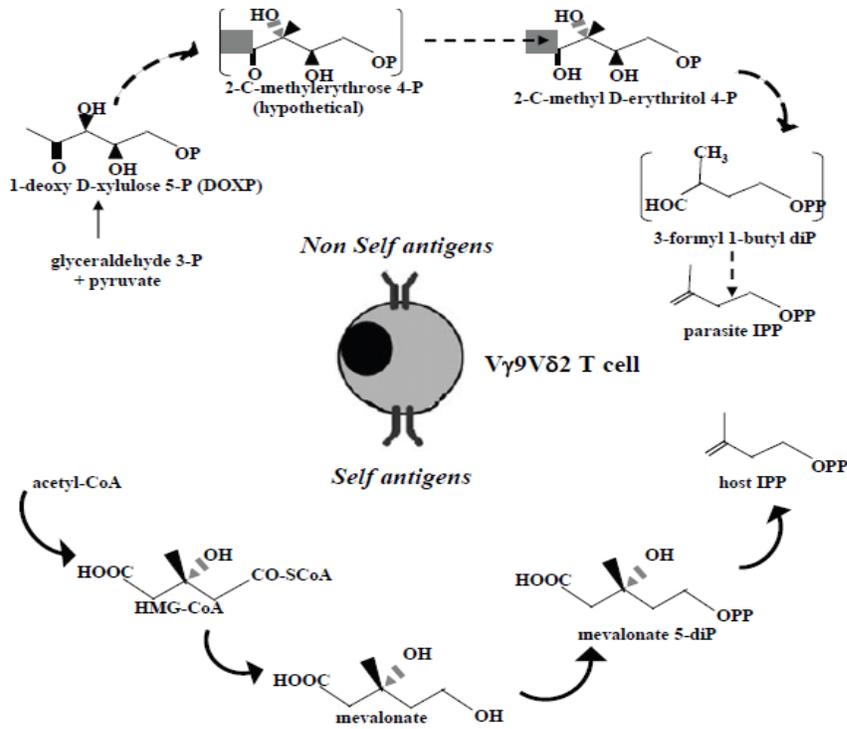


Fig.8 Ligandi riconosciuti dai linfociti T $\gamma\delta$

Queste molecole, caratterizzate da un pirofosfato o da un'ammina all'estremità distale di uno scheletro a cinque atomi di carbonio, vengono rilasciate in elevate concentrazioni in condizioni patologiche e vengono prodotte rispettivamente tramite la via metabolica 1-Deossi-5-Xiluloso-5-Fosfato (DOXP) e tramite la via sintetica del Mevalonato (MVA), nota anche come via metabolica dell'idrossimetilglutaril-CoA riduttasi (HMG-CoA), quest'ultima essenziale nelle cellule dei mammiferi per la sintesi degli steroli, per la crescita cellulare e l'integrità della membrana plasmatica cellulare. Inoltre, le cellule T V γ 9V δ 2 possono essere anche attivate da amminobifosfonati, una classe di farmaci utilizzati nel trattamento di alcune forme tumorali, attraverso un meccanismo di tipo indiretto che comporta l'inibizione

dell'enzima farnesil pirofosfato sintetasi (FPPS) coinvolto nella biosintesi del colesterolo. Questa inibizione, agendo a valle della sintesi dell'IPP, porta all'accumulo endogeno dello stesso che viene direttamente riconosciuto dalla cellule T $V\gamma9V\delta2$. Tenendo conto del riconoscimento peptide/MHC da parte dei recettori TCR $\alpha\beta$, il riconoscimento dei fosfoantigeni da parte delle cellule $V\gamma9V\delta2$ presenta infatti inusuali caratteristiche. Questi ligandi infatti sembrano legarsi direttamente ai recettori TCR, permettendo in questo modo alle cellule $T\gamma\delta$ di rispondere ai fosfoantigeni esogeni solubili, coadiuvate anche dall'intervento delle cellule APCs che attraverso il riconoscimento di molecole costimolatorie facilitano la risposta ai fosfoantigeni stessi (Fig.9).

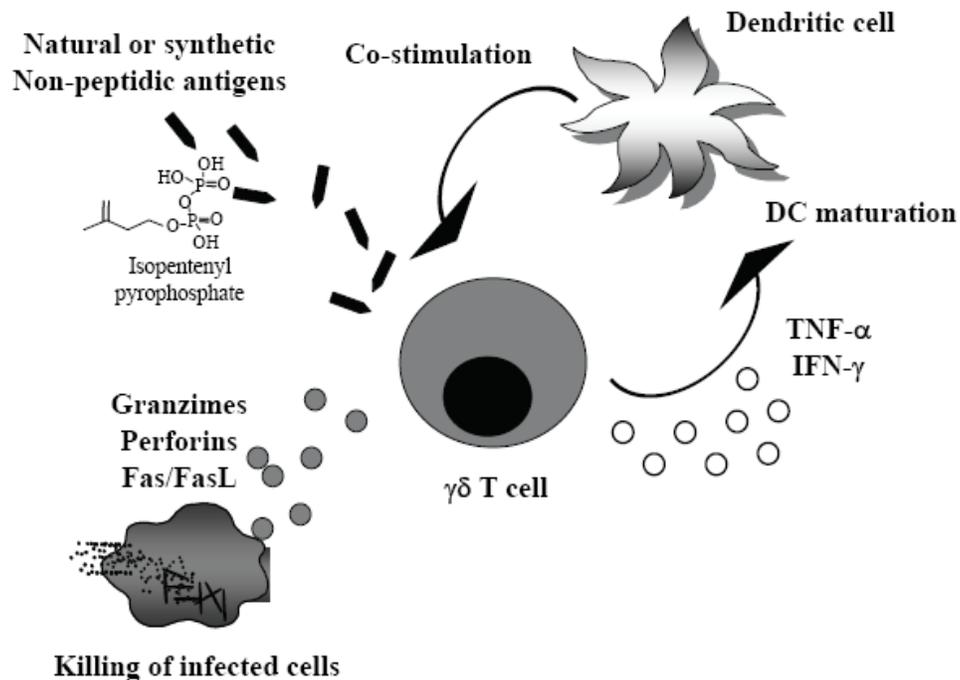


Fig.9 Meccanismo di riconoscimento dei fosfoantigeni da parte dei linfociti $T\gamma\delta$

Sebbene l'attività delle cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ predomini durante le infezioni micobatteriche, le cellule T $V\delta 1$ sono preferenzialmente attivate in pazienti affetti da infezione da HIV o in soggetti immunocompromessi in fase di riattivazione da parte del citomegalovirus (CMV) (50). Condizioni patologiche sono in grado di attivare rapidamente e selettivamente i linfociti $T\gamma\delta$ che, in conseguenza di ciò, producono citochine pro-infiammatorie come l'IFN- γ ed il TNF- α , ed esplicano attività citotossica mediante il rilascio di molecole di perforina, granulisina e granzimi (51). Similmente ai linfociti T CD4 e CD8 $\alpha\beta$, i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ sono eterogenei e comprendono diversi subsets che possono essere distinti sulla base dell'espressione di markers di superficie e delle funzioni effettrici esplicate. In base al profilo di espressione delle molecole CD45RA e CD27, i linfociti $T\gamma\delta$ possono essere distinti in (Fig.10):

- ***Naive (T_{NAIVE})***
- ***Central memory (T_{CM})***
- ***Effector memory (T_{EM})***
- ***Effector memory terminally differentiated (T_{EMRA})***

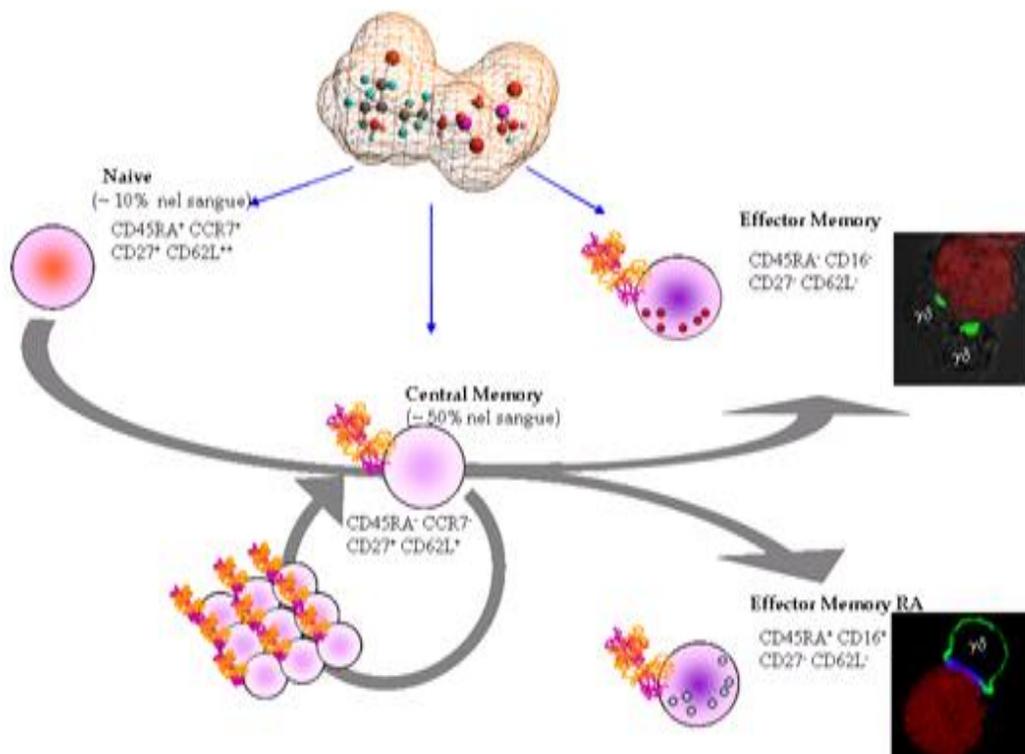


Fig.10 I subsets dei linfociti T $\gamma\delta$

Le cellule T_{NAIVE} (CD45RA⁺/CD27⁺) e T_{CM} (CD45RA⁻/CD27⁺) esprimono recettori di homing per i linfonodi come CCR7 e CD62L e non possiedono funzioni effettrici; i linfociti T_{NAIVE} sono cellule che non hanno mai incontrato l'antigene e che, in seguito a stimolo antigenico, possono differenziarsi in parte in cellule effettrici che espletano funzioni tali da determinare l'eliminazione dell'organismo patogeno, quali l'attività citotossica o il rilascio di citochine in grado di coinvolgere altre cellule del sistema immunitario, e in parte in cellule della memoria che, in seguito a un secondo incontro con l'antigene, potranno determinare una risposta immunitaria più rapida differenziandosi in cellule effettrici. I linfociti T_{EM} (CD45RA⁻

/CD27) invece, incrementano l'espressione di molecole effettrici come perforina o IFN- γ , rappresentano un pool cellulare prontamente disponibile alla risposta contro l'antigene, sono scarsamente rappresentati nei linfonodi e vengono richiamati nei siti infiammatori tramite recettori per chemochine di natura infiammatoria. I linfociti T_{EM} hanno la capacità di differenziarsi ulteriormente generando le cellule T_{EMRA} (CD45RA⁺/CD27⁻), le quali svolgono esclusivamente attività citotossica determinata dal rilascio di molecole citotossiche ad azione diretta e indiretta nei confronti di cellule target e predominano anch'esse nei siti infiammatori (52), ma sono destinate a morire precocemente poiché risultano essere caratterizzate da estremità telomeriche che presentano una minore lunghezza rispetto alle cellule non differenziate. I pathways di differenziazione che portano alla generazione di queste cellule, in particolare T_{EM} e T_{EMRA}, sono comunque ancora incerti. Poiché i linfociti T V γ 9V δ 2 T_{NAIVE}, T_{CM}, T_{EM}, T_{EMRA} possiedono differenti capacità migratorie tra i tessuti linfoidi e non linfoidi è possibile che abbiano accesso a differenti regioni corporee e possibilmente rispondano a differenti stimoli sebbene la responsività delle cellule T V γ 9V δ 2 naive e memory alle citochine non è stata ancora del tutto chiarita. È comunque probabile che l'ingresso e la loro permanenza in particolari tessuti e organi, e quindi il microambiente, ne determini la sopravvivenza, la differenziazione e addirittura la morte (Fig.11).

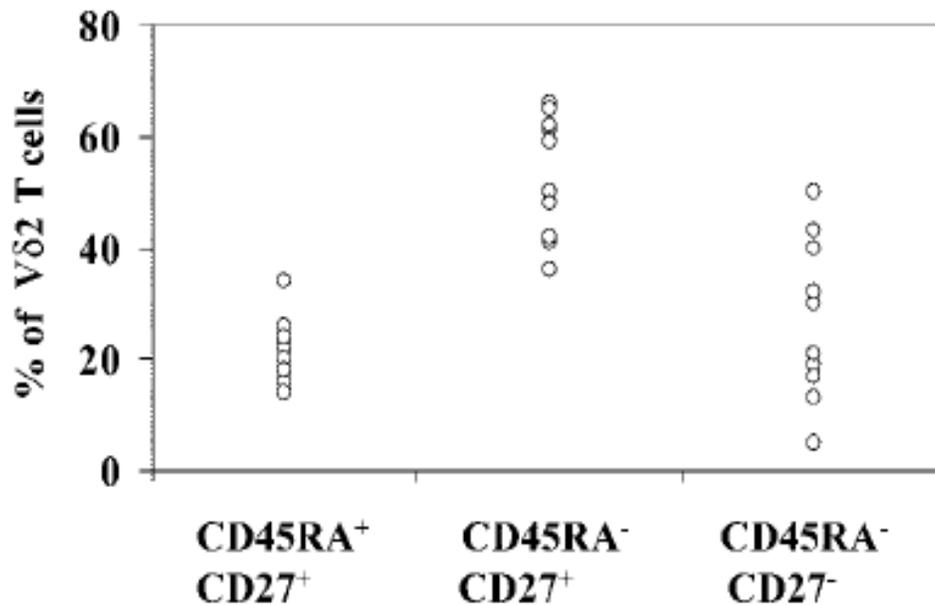


Fig.11 Distribuzione dei vari subsets dei linfociti $T_{\gamma\delta}$

Il fenotipo e la funzione dei vari subsets potrebbero quindi essere influenzati non solo dalla presenza dell'antigene ma anche da meccanismi omeostatici, come l'IL-15. *In vitro*, diversi studi suggeriscono che l'espressione del recettore per l'IL-15 e la risposta a questa citochina è bassa nelle cellule T_{NAIVE} ed incrementa progressivamente nelle cellule T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA} . Inoltre, mentre le cellule stimulate con l'antigene acquisiscono un fenotipo T_{CM} o T_{EM} , le cellule stimulate con l'IL-15, in assenza di antigene, danno origine sia a cellule che mantengono il loro fenotipo T_{CM} che a cellule T_{EM} o T_{EMRA} . Le citochine coinvolte nel mantenimento e nell'omeostasi delle cellule T sono: l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 e l'IL-15, citochine che sono in grado di legare strutture recettoriali caratterizzate dalla presenza di catene γ . In particolare, l'IL-15 gioca un ruolo essenziale nell'omeostasi cellulare e viene prodotta da

vari tipi cellulari tra cui le cellule dendritiche. La responsività alle citochine e l'espressione del recettore per l'IL-15 (IL-15R) non risulta essere molto elevata nelle cellule T_{NAIVE} , mentre incrementa progressivamente nelle cellule T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA} . Di contro, la capacità di proliferazione in risposta all'antigene o alla stimolazione citochinica ha mostrato un pattern reciproco ed è associata alla resistenza alla morte cellulare e all'espressione di Bcl-2.

A differenza degli studi svolti su modelli sperimentali murini, pochi studi hanno invece indagato sulla produzione di IL-17 da parte dei linfociti $T_{V\gamma9V\delta2}$ umani, cellule riscontrate sia nel sangue periferico di soggetti sani che in pazienti con infezioni acute da *M. tuberculosis* (53) e HIV (54), presenti in quest'ultimo caso con valori leggermente aumentati. Nell'ambito di questi studi non sono però state delineate né le caratteristiche dei linfociti $T_{\gamma\delta}$ che producono IL-17 e IL-22, né esaminate nel dettaglio le citochine richieste per la differenziazione di questi subsets. Il potenziale ruolo dei linfociti $T_{\gamma\delta}$ in grado produrre IL-17 nel sistema immune umano rimane quindi ancora da chiarire. I risultati di recenti ricerche hanno dimostrato che i linfociti $T_{V\gamma9V\delta2}$ che producono IL-17A e IL-22 sono presenti ad una bassa, ma significativa frequenza, nei primati umani e non umani (55), dimostrando che tali cellule possono essere polarizzate in sottopopolazioni Th17 (singola produzione di IL-17), Th1/17 (produzione sia di IFN- γ che IL-17) e Th22 (singola produzione di IL-22) attraverso l'azione di distinte citochine che agiscono nella fase iniziale del differenziamento e nel successivo mantenimento. Questi esperimenti sono inoltre stati condotti utilizzando, come sorgente di cellule $T_{V\gamma9V\delta2}$, PBMC non separate e anche in questo caso non sono stati esaminati né il ruolo funzionale di queste cellule né il loro coinvolgimento patogenetico o protettivo nell'ambito della risposta immunitaria *in vivo* (55).

Obiettivo della tesi

Scopo di questo studio è stato quello di valutare la produzione di IL17 da parte dei linfociti T $\gamma\delta$ umani in presenza delle medesime citochine che inducono la differenziazione dei linfociti Th17 umani. Al fine di eseguire la sperimentazione su una popolazione cellulare arricchita di linfociti T $\gamma\delta$ con fenotipo naive, è stata eseguita una separazione immunomagnetica per i marcatori di superficie CD27 e CD45RA ed è stata testata l'azione delle citochine che guidano il differenziamento verso la produzione di IL17 sia sulle cellule CD27⁺ CD45RA⁺ in presenza di fosfoantigene (IPP) che sugli altri subsets di linfociti T $\gamma\delta$ (CD27⁻). È stata inoltre condotta l'analisi molecolare per stabilire se la differenziazione fenotipica è supportata dall'espressione del fattore di trascrizione ROR γ t, il principale fattore di trascrizione implicato nel differenziamento Th17. Interesse di questo studio è stato inoltre quello di analizzare sia le caratteristiche fenotipiche che funzionali delle cellule V γ 9V δ 2 IL17⁺, oltre a chiarire, *in vivo*, il coinvolgimento di queste cellule nella patogenesi delle risposte infiammatorie causate da infezioni batteriche. A tal fine è stata analizzata la capacità dei linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ di promuovere la fagocitosi e la chemiotassi dei granulociti neutrofili attraverso l'influenza esercitata da fattori solubili rilasciati da colture di linfociti T $\gamma\delta$, stimolati e non stimolati con il fosfoantigene in presenza del cocktail di citochine. È stata inoltre verificata la capacità dell'IL17, prodotta dai linfociti T $\gamma\delta$, di promuovere il rilascio di β -defensine da parte delle cellule epiteliali tissutali, ed infine, per l'ulteriore caratterizzazione di queste cellule è stato studiato il profilo di espressione dei recettori per chemochine.

Materiali e metodi

Campioni utilizzati per lo studio.

I buffy coats di volontari sani sono stati ottenuti dal Centro Trasfusionale del Policlinico di Palermo. Inoltre, campioni di cellule mononucleate del sangue periferico e del liquido cerebrospinale sono stati prelevati da 12 bambini con meningite batterica (9 maschi, 3 femmine, di $7.8 + 4.9$ anni, range compreso tra 3 e 14 anni) provenienti dall'Ospedale dei Bambini G. Di Cristina di Palermo. La diagnosi di meningite batterica è stata posta sulla base della sintomatologia clinica, storia clinica, tomografia computerizzata (CT), osservazione del liquido cerebrospinale ed esito positivo delle colture dello stesso. Dall'Ospedale dei Bambini G. Di Cristina di Palermo sono stati reclutati 8 bambini (4 maschi, 4 femmine, di $9.2 + 3.4$ anni, range compreso tra 5 e 14 anni), affetti da altre patologie neurologiche non infiammatorie, i quali sono stati sottoposti a puntura lombare per scopo diagnostico e utilizzati come controlli. Nessuno dei pazienti reclutati, né i bambini controllo, presentavano l'infezione da HIV, né assumevano, al momento del prelievo, farmaci steroidei o erano sottoposti ad altri trattamenti farmacologici. È stato inoltre ottenuto il consenso informato sia dai pazienti che dai soggetti controllo.

Separazione e colture cellulari.

I monociti CD14⁺ e i linfociti T V γ 9V δ 2 del sangue periferico sono stati separati tramite selezione positiva rispettivamente con microbiglie CD14 e V δ 2-specifiche (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Le cellule dendritiche sono state ottenute da monociti separati CD14⁺ messi in coltura per 5-6 giorni in presenza del fattore stimolante le colonie dei granulociti-macrofagi (GM-CSF, 25 ng/ml) ed interleuchina-4 (IL-4, 1000 U/ml) (entrambe le citochine sono state fornite dall'Euroclone, Milano, Italia) (56).

Linfociti T V γ 9V δ 2 naive sono stati isolati con un elevato grado di purezza, superiore al 99%, in seguito alla marcatura eseguita con l'anticorpo anti-CD27 coniugato con il fluorocromo PE (BD Biosciences, San Josè, CA) e anti-CD45RA coniugato con il fluorocromo APC (BD Biosciences) e successivo sorting cellulare tramite FACSAria (BD Biosciences). Le cellule così ottenute sono state messe in coltura in terreno IMDM o RPMI-1640 (Euroclone) supplementato con 2 mM di L-glutamina, 20 nM di HEPES, 10 μ g/ml di gentamicina, 100 U/ml di penicillina/streptomina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e il 10% di siero umano inattivato al calore (pool AB⁺, gentilmente fornito dalla Centro Trasfusionale del Policlinico di Palermo).

I linfociti T V γ 9V δ 2 naive sortati (5×10^4 cellule) sono stati messi in piastre da 96 pozzetti con fondo ad U, con un numero equivalente di cellule dendritiche irradiate (30 Gy da una sorgente di cesio), l'isopentenil pirofosfato (IPP; Sigma-Aldrich; concentrazione finale 10^{-5} M) insieme al TGF- β ricombinante (concentrazione finale di 10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-1 β (concentrazione finale di 10 ng/ml, R&D Systems), IL-6 (concentra-

zione finale di 50 ng/ml, BD Biosciences) e IL-23 (concentrazione finale di 10 ng/ml, R&D Systems), addizionate in tutte le possibili combinazioni. Al 6° giorno metà del terreno è stato rinnovato aggiungendo l'IL-2 ricombinante (concentrazione finale di 20 IU/ml, Novartis Pharma) e la coltura è stata mantenuta per ulteriori 6 giorni. In alcuni esperimenti le diverse combinazioni delle citochine polarizzanti sono state aggiunte 6 ore dopo l'iniziale stimolazione con l'IPP.

Analisi citofluorimetrica ed ELISA

L'espressione di markers di superficie da parte dei linfociti T V γ 9V δ 2 è stata studiata mediante analisi citofluorimetrica (FACS). A tale scopo sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali purificati o coniugati con i fluorocromi -FITC, -PE, -PE-Cy5 o -APC: anti-TCRV δ 2 (B6, BD Biosciences), anti-CD16 (3G8, BD Biosciences), anti-CD56 (B159, BD Biosciences), anti-CD161 (DX12, BD Biosciences), anti-granzyme B (GB11, eBioscience), anti-Fas Ligand (FasL, 2C101, Alexis through Vinci Biochem, Firenze, Italy), anti-TRAIL (RIK-2, eBioscience), anti-NKG2D (1D11, eBioscience), anti-perforin (δ G2, Vinci Biochem), anti-CCR3 (61828.111, R&D Systems), anti-CCR4 (1G1, BD Biosciences), anti-CCR5 (2D7, BD Biosciences), anti-CCR6 (11A9, BD Biosciences), anti-CXCR3 (1C6/CXCR3, BD Biosciences), anti-CXCR5 (51505; R&D Systems) e il controllo isotipico.

La marcatura intracellulare per l'IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-22 è stata condotta sui linfociti T V γ 9V δ 2 stimolati per 6 ore con IPP (concentrazione finale 10⁻⁵ M) in presenza di GolgiStop (BD Biosciences) nelle ultime 3 ore di coltura. Le cellule, successivamente,

sono state fissate e permeabilizzate con Cytofix/Cytoperm Plus (BD Biosciences) seguendo le

modalità indicate dal protocollo, ed in seguito, incubate con l'anticorpo monoclonale anti-IFN γ FITC (B27, BD Biosciences), l'anti-IL-4 PE (8D4-8, BD Biosciences), l'anti-IL-22 PE (142928, R&D Systems), l'anti-IL-10 PE (JES5-16E3, BD Biosciences), l'anti-IL-17 APC (eBIO64-DEC17, eBioscience, San Diego, CA), ed il controllo isotipico. Le cellule sono state lavate, e i campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro FACSCanto (BD Biosciences) e analizzati con un software FlowJo (Tree Star). Le cellule vitali sono state individuate tramite i parametri di forward e side scatter e le analisi sono state condotte su 100.000 eventi acquisiti per ogni campione.

Infine, la capacità di produrre citochine da parte dei linfociti T V γ 9V δ 2 attivati è stata stabilita tramite stimolazione delle cellule (10^5 /ml) per 24 ore con IPP (concentrazione finale 10^{-5} M). Le citochine rilasciate nei supernatanti delle colture sono stati saggiati tramite ELISA seguendo la procedura indicata dal protocollo (R&D Systems).

Test di fagocitosi e di migrazione.

I neutrofili sono stati isolati dal sangue periferico di soggetti sani tramite la tecnica della centrifugazione Polymorphoprep (Nycomed Pharma) (57). Il grado di purezza dei neutrofili umani era del 95%, come stimato in seguito all'impiego della colorazione di Wright-Giemsa. Il saggio di migrazione è stato condotto posizionando le cellule (10^5 /ml) nella parte inferiore di una camera di Boyden (Neuro Probes) con una membrana che presenta pori da 3 μ m. I linfociti T V γ 9V δ 2 (10^5 /ml) sono stati posizionati nella parte inferiore della

camera, con o senza IPP (58). In alcuni esperimenti sono stati aggiunti anticorpi monoclonali neutralizzanti anti CXCL8 (6217, R&D Systems) ed il controllo isotipico. Dopo 3 ore di in-

cubazione a 37°C, i neutrofili migrati attraverso la membrana sono stati individuati utilizzando una colorazione Giemsa modificata (DiffQuik). La chemiotassi dei neutrofili è stata quantificata come percentuale di cellule migrate verso lo stimolo chemiotattico.

Lo studio dell'attività fagocitica è stato invece condotto incubando i neutrofili, separati secondo la modalità precedentemente descritta, con microbiglie fluorescenti PE-positive in presenza di linfociti T V γ 9V δ 2 (10⁵/ml) e IPP (concentrazione finale 10⁻⁵ M). In alcuni esperimenti è stato anche aggiunto nelle colture l'anticorpo monoclonale neutralizzante anti-CXCL8 (6217, R&D Systems) ed il controllo isotipico. Dopo 2 ore di incubazione, la percentuale di neutrofili PE-positivi è stata determinata tramite analisi FACS.

Saggio ELISA per la β -defensina.

Le linee di cellule epiteliali tumorali HT29 sono state utilizzate come sorgente di β -defensina. Le cellule HT29 (10⁵/ml) sono state incubate con i linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ (10⁵/ml) in presenza o meno di IPP (concentrazione finale 10⁻⁵ M). E' stato anche allestito un controllo negativo (per esempio IPP o medium da solo senza linfociti T V γ 9V δ 2) e, in alcuni esperimenti, è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale neutralizzante anti-IL17 (eBio64-DCE17, eBioscience) o il controllo isotipico.

PCR real-time quantitativa.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando l'ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Perkin-Elmer Applied Biosystems) seguendo le istruzioni del protocollo. Il kit MMLV Reverse Transcriptase kit (Stratagene) è stato invece utilizzato per la sintesi di cDNA. I trascritti sono stati quantificati tramite PCR real-time su ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems) utilizzando il kit TaqMan Gene Expression Assays dell'Applied Biosystems utilizzando i reagenti indicati dai protocolli. Le sonde impiegate sono state le seguenti (secondo i numeri identificativi del kit dell'Applied Biosystems): RORC, Hs01076112_m1; TBX21, Hs00203436_m1; IL17A, Hs99999082_m1; IFNG, Hs99999041_m1; IL1BR, Hs00168392_m1; IL6R, Hs00169842_m1; IL23R, Hs00332759_m1; TGFBR, Hs00188614_m1.

Analisi statistica.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato un *t*-test a due code o un *t*-test con la correzione di Welch. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Fattori che inducono la differenziazione dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ verso la produzione di IL-17.

Al fine di identificare le condizioni sperimentali che permettono *in vitro* la polarizzazione dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ umani verso la produzione di IL-17, i subsets altamente purificati di cellule $\gamma\delta$ naive (T_{NAIVE} , $CD45RA^+CD27^+$), central memory (T_{CM} , $CD45RA^-CD27^+$), effector memory (T_{EM} , $CD45RA^-CD27^-$) ed effettrici terminalmente differenziate (T_{EMRA} , $CD45RA^+CD27^-$) provenienti dal sangue periferico sono stati stimolati per 6 giorni con cellule dendritiche autologhe irradiate in presenza di fosfoantigene (IPP), ed in presenza di differenti citochine utilizzate sia singolarmente che in diverse combinazioni. La coltura è stata mantenuta per ulteriori 6 giorni in presenza di basse dosi di IL-2 e le cellule sono state analizzate, mediante marcatura intracellulare dopo stimolazione con IPP, al 12° giorno, per 6 ore, e tramite ELISA in seguito a stimolazione con IPP per 24 ore, per la loro capacità di produrre IFN- γ e IL-17.

Inoltre, dal momento che la promozione della polarizzazione Th17 richiede la stimolazione del recettore arilico (AhR), le colture cellulari sono state allestite sia in terreno RPMI-1640 che IMDM, quest'ultimo contenente concentrazioni più elevate di aminoacidi aromatici. I dati cumulativi della marcatura intracellulare ottenuti da 15 differenti soggetti sani sono riportati nella Fig.12; la Fig.13 mostra un FACS plot rappresentativo; nella Fig.14 sono invece rappresentati i risultati del saggio ELISA.

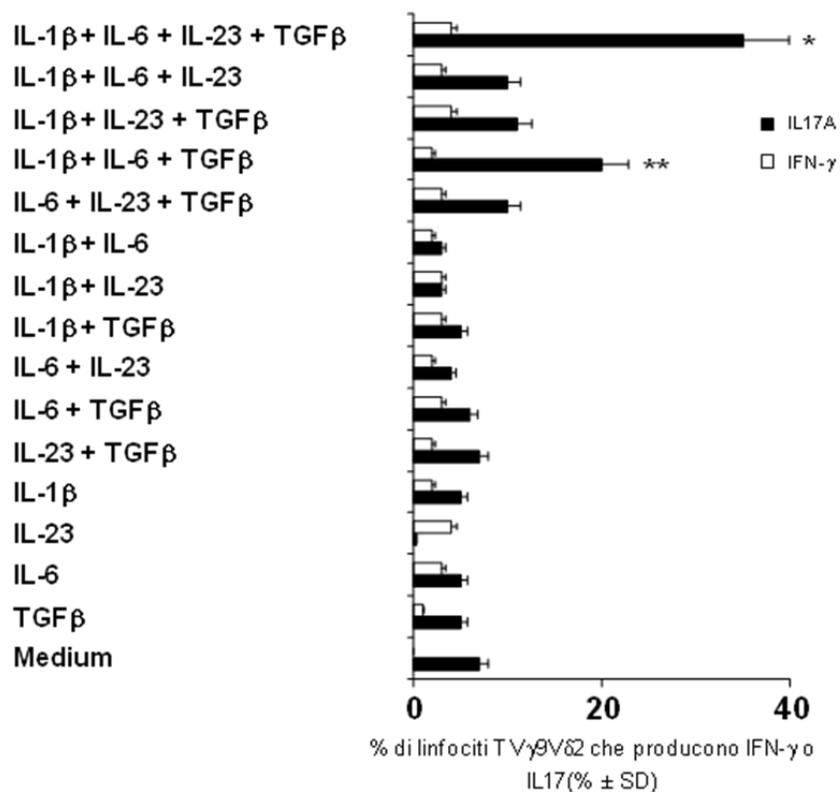


Fig.12 Polarizzazione dei linfociti T Vγ9Vδ2 in cellule che producono IL-17 indotta dalla stimolazione antigenica e dalle citochine IL-1β, IL-6, IL-23 e TGF-β

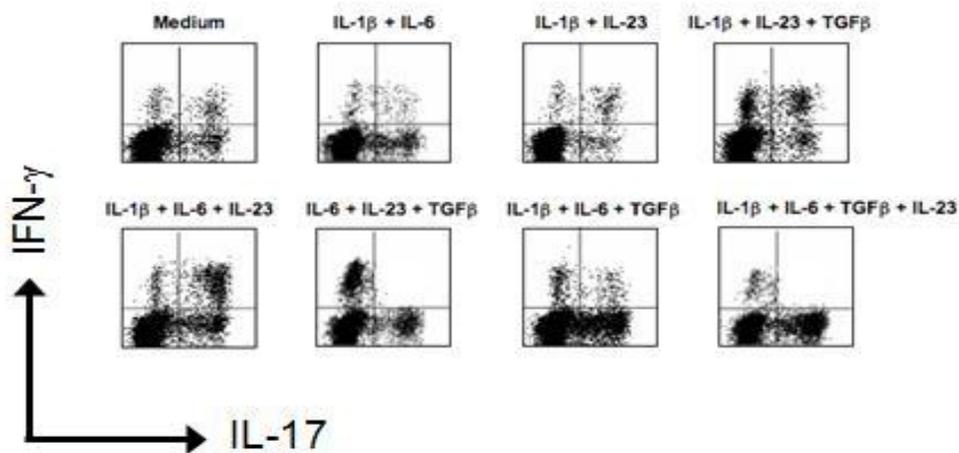


Fig.13 Pannello citofluorimetrico rappresentativo

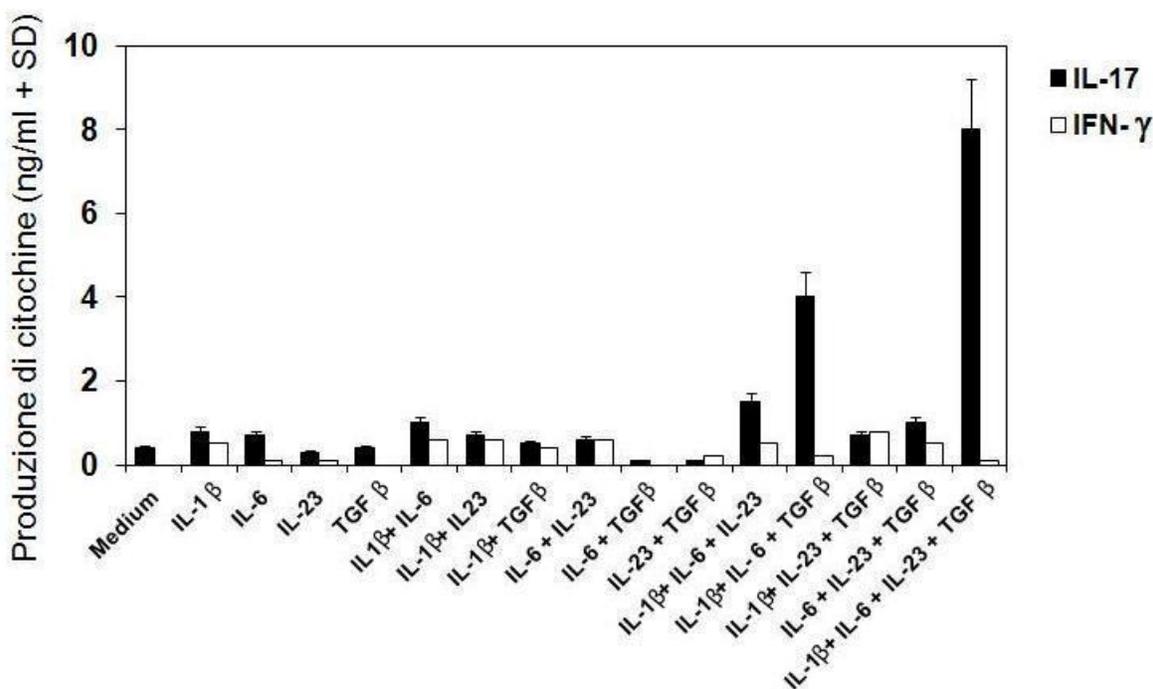


Fig.14 Valori di IFN- γ e di IL17 ottenuti dall'analisi, mediante metodica ELISA, dei sovranatanti di coltura dei linfociti $\gamma\delta$

In assenza di citochine esogene, solo una piccola percentuale (intorno al 7%) di linfociti T $V\gamma9V\delta2$ stimolati acquisiscono la capacità di produrre IL-17 ma non IFN- γ . L'IL-1 β , l'IL-6 e il TGF- β utilizzati singolarmente non aumentano il livello di questa produzione spontanea, mentre l'IL-23 è in grado di sopprimere la produzione di IL-17 e di potenziare la produzione di IFN- γ . Allo stesso modo, l'aggiunta di due citochine in varie combinazioni non è in grado di indurre la differenziazione dei linfociti T $V\gamma9V\delta2$ verso la produzione di IL-17. L'uso combinato di IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23 è invece uno stimolo adeguato per una significativa differenziazione dei linfociti T $V\gamma9V\delta2$ verso la produzione di IL-17 (35%), la maggior parte dei quali non è in grado di produrre IFN- γ (Fig.12 e 13).

La presenza del cocktail completo di citochine determina, inoltre, un significativo incremento dell'indice di proliferazione generale dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ che producono IL-17 (35%) e, anche in questo caso, il fenomeno interessa solo le cellule in grado di produrre IL-17 ma non quelle che producono IFN- γ (Fig. 13 e 14). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti in seguito al dosaggio dell'IL-17 e dell'IFN- γ nei supernatanti delle colture tramite saggio ELISA (Fig.14).

Similmente ai linfociti $T\alpha\beta CD4^+$, i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ con fenotipo T_{NAIVE} rappresentano l'unico subset in grado di essere polarizzato verso cellule che producono IL-17, mentre gli altri subsets (T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA}), analizzati in condizioni simili (in presenza cioè di IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23), non sono in grado di differenziarsi in tal senso (dati non mostrati). In definitiva, la polarizzazione dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ in cellule IL-17 $^+$ avviene soltanto quando la coltura viene condotta in terreno IMDM e non in RPMI-1640 (dati non mostrati) indicando che, anche nel caso dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$, similmente a quanto accade per i linfociti T $CD4 \alpha\beta$, un'efficiente polarizzazione verso la produzione di IL-17 richiede la stimolazione del recettore arilico.

Al fine di caratterizzare ulteriormente i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ differenziatisi *in vitro* per la produzione di IL-17, è stata valutata anche la produzione di altre citochine. Come mostrato in Fig.15, quasi tutte le cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ produttrici di IL-17 non producono IFN- γ , IL-4 e IL-10. Inaspettatamente, e a differenza dei linfociti T $CD4 \alpha\beta$, i linfociti $T\gamma\delta$ che producono IL-17 non sono in grado di sintetizzare IL-22, una tipica citochina Th17. Questi risultati, inoltre, differiscono da quelli riportati in un recente lavoro nel quale viene dimostrato che le citochine richieste per la generazione di linfociti $T\gamma\delta$ in grado di produrre IL-22 sono le stesse osservate per lo sviluppo dei linfociti $T\gamma\delta$ polarizzati verso la produzione di IL-17, anche se tali popolazioni sono distinte.

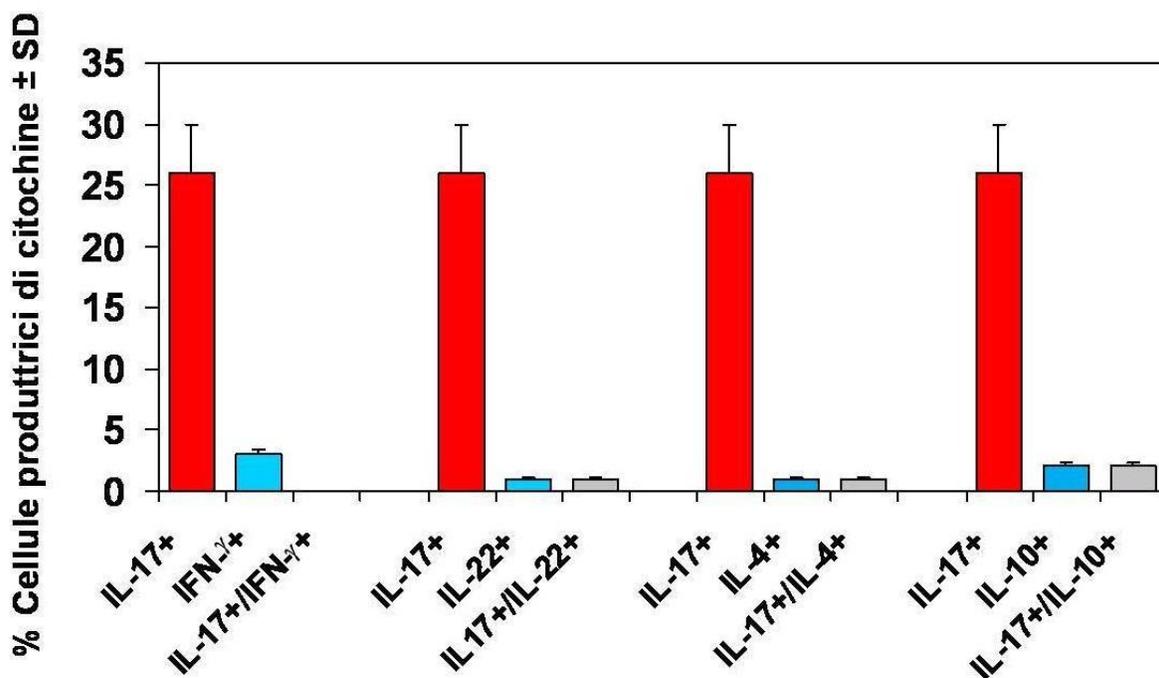


Fig.15 Analisi intracellulare delle citochine IL-17, IFN- γ , IL-22, IL-4 e IL-10 prodotte dai linfociti T V γ 9V δ 2 naive stimolati per 6 giorni con cellule dendritiche irradiate e IPP in presenza di citochine polarizzanti, incubati per ulteriori 6 giorni in presenza di IL-2, e stimolati per 6 ore con IPP prima della marcatura intracellulare.

La differenziazione dei linfociti CD4 α β Th17 coinvolge l'up-regolazione coordinata dei fattori di trascrizione ROR γ t (RORC2) e ROR α . È stata quindi valutata nelle cellule T V γ 9V δ 2 produttrici di IL-17 l'espressione dell'mRNA che codifica per i geni orologi umani del topo ROR γ t (RORC) e T-bet (TBX21). Come mostrato in Fig.16, i linfociti T V γ 9V δ 2 naive messi in coltura in condizioni IL-17 polarizzanti (IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23) presentano un'elevata espressione del gene RORC, mentre l'espressione del gene TBX21 è indotta solo a bassi livelli.

Nel loro complesso, questi risultati indicano che l'IL-1 β , l'IL-6, il TGF- β e l'IL-23 inducono nei linfociti T V γ 9V δ 2 l'espressione del gene RORC che codifica per il principale fattore di trascrizione coinvolto nella produzione di IL-17.

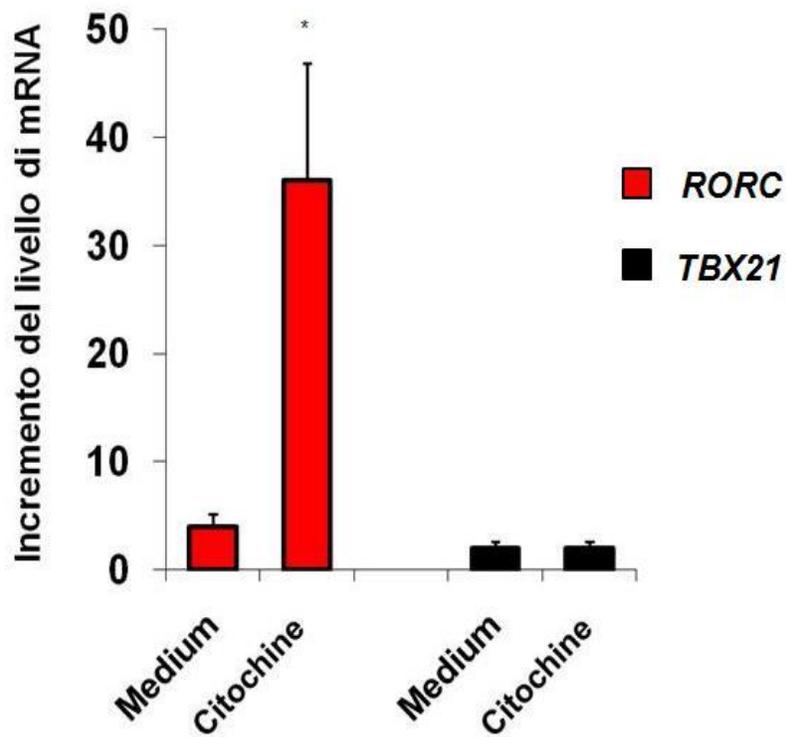


Fig.16 PCR-real time dell'espressione di RORC e TBX21 in linfociti T V γ 9V δ 2 stimolati con l'antigene, in presenza o in assenza di citochine polarizzanti. I dati rappresentano la media \pm SD di 6 diversi donatori.

Ruolo della stimolazione antigenica e delle citochine nella regolazione dei fattori di trascrizione linea-specifici.

Lo sviluppo di un subset CD4 Th17 richiede *in vivo* 5 giorni e la stimolazione tramite antigeni specifici in presenza di citochine polarizzanti, quali IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23.

Questa

iniziale attivazione comporta l'up-regolazione di STAT3 e l'espressione di RORC, che a loro volta aumentano la responsività all'IL-23 inducendo la produzione di IL-17. Studi condotti sui topi hanno invece dimostrato che i linfociti T $\gamma\delta$ che risiedono nei tessuti periferici possono essere attivati in presenza di citochine, come l'IL-23 e l'IL-1 β , utilizzate da sole o insieme al riconoscimento diretto di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) attraverso recettori deputati a questa funzione (PRRs) o attraverso il recettore dei linfociti T (TCR). Dal momento che queste cellule esprimono costitutivamente i fattori trascrizionali per la produzione di IL-17, esse sono in grado di sintetizzare questa citochina entro poche ore dall'attivazione.

Al fine di analizzare gli eventi iniziali che conducono alla differenziazione dei linfociti T V γ 9V δ 2 umani che producono IL-17, così come il ruolo della stimolazione antigenica e delle citochine polarizzanti, abbiamo valutato le cinetiche di espressione di mRNA che codificano per differenti recettori per citochine, come RORC e IL-17A e, a differenza di ciò che accade nel sistema murino, i linfociti T V γ 9V δ 2 umani non stimolati non esprimono costitutivamente né recettori per citochine IL-17 polarizzanti (*IL1 β R*, *IL6R*, *IL23R* e *TGF β R*), né *IL2R* (dati non mostrati); inoltre, come atteso, tali cellule non esprimono né RORC né IL17A (Fig.17). La stimolazione del recettore TCR dei linfociti V γ 9V δ 2 tramite

fosfoantigeni induce l'espressione, in maniera significativa, di *IL1 β R*, *IL6R*, *TGF β R* e, a minore intensità,

dell'mRNA per l'*IL23R*, già dopo 6 ore di stimolazione (Fig.17). L'espressione dell'mRNA per *IL1 β R*, *IL6R*, *TGF β R* e *IL23R* è transitoria, dal momento che è considerevolmente diminuita al 3° giorno e declina al 6° giorno (Fig.17). La sola stimolazione antigenica non è sufficiente ad indurre livelli apprezzabili di mRNA per RORC e IL17A (Fig.17), indicando che l'up-regolazione dei fattori di trascrizione linea-specifici richiede la combinazione delle citochine IL-17 polarizzanti. Inoltre, è stato osservato che RORC e l'IL-17A sono indotti in maniera significativa in seguito alla stimolazione con il fosfoantigene effettuata in presenza di IL-1 β , IL-6, e TGF- β e, a livelli più elevati, tramite il fosfoantigene e la combinazione di IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23 (Fig.17). L'aggiunta invece di due delle suddette citochine utilizzate in varie combinazioni, o soltanto di una di queste citochine, non induce affatto o induce a bassi livelli l'espressione di RORC e di IL-17A, in accordo con la loro incapacità di determinare il differenziamento dei linfociti T V γ 9V δ 2 verso la produzione di IL-17. Nei linfociti T V γ 9V δ 2 stimolati con il fosfoantigene in presenza della combinazione completa di citochine (IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23), l'mRNA che codifica per RORC e IL-17A raggiunge un picco tra il 3° e il 6° giorno, e decrementa dal 9° giorno in poi (Fig. 17).

Nel loro complesso questi risultati indicano che l'azione congiunta della stimolazione del recettore TCR tramite fosfoantigene e la presenza delle citochine IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23 induce, nei linfociti T V γ 9V δ 2, elevati livelli di espressione di RORC e IL17A, in accordo con la loro capacità di promuovere la differenziazione e polarizzazione di queste cellule verso la produzione di IL-17.

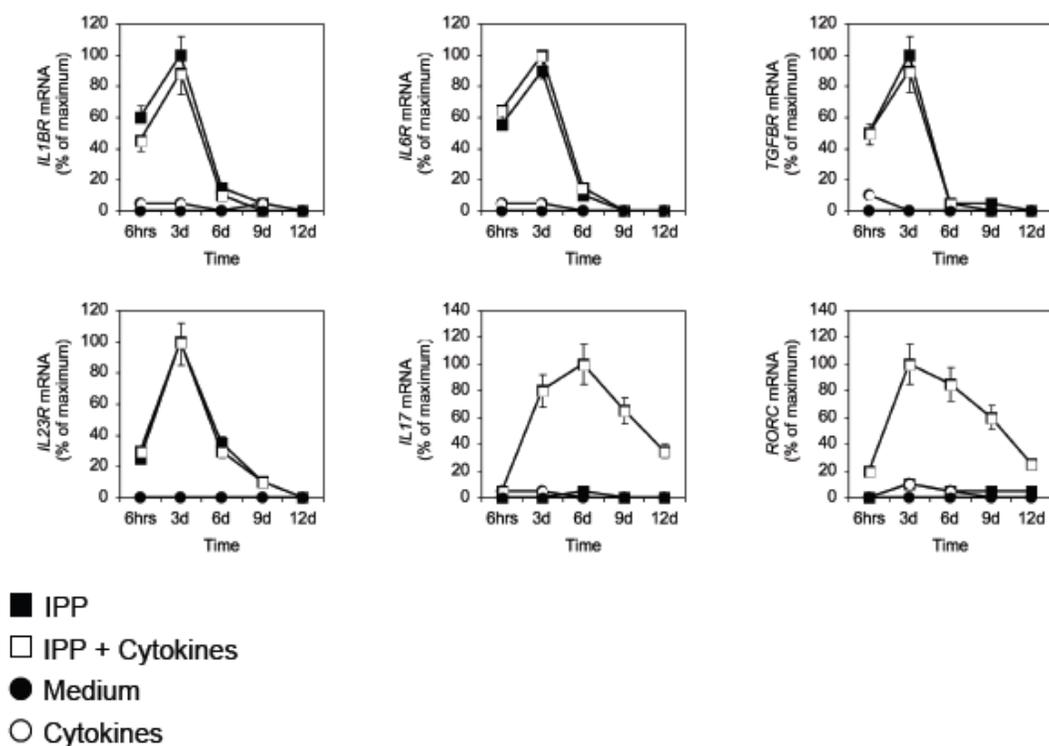


Fig.17 La stimolazione antigenica e le citochine regolano differenzialmente l'espressione di fattori di trascrizione linea-specifici nei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IL17^+$

Fenotipo dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IL-17^+$

Analogamente ai linfociti T $CD4 \alpha\beta$, abbiamo precedentemente descritto che i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ umani del sangue periferico possono essere suddivisi in diverse popolazioni distinte sulla base del profilo di espressione di molecole di superficie e delle funzioni effettrici svolte (59), come la secrezione di citochine e l'attività citotossica. Per caratterizzare il grado di differenziamento dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ in condizioni $IL-17$ polarizzanti, è stata

condotta la marcatura di superficie per le molecole CD27 e CD45RA ed è stato osservato che, mentre il fenotipo delle cellule che producono solo l'IFN- γ è principalmente T_{EM} e, per una piccola percentuale, T_{EMRA} (Fig.18A), la maggior parte dei linfociti T V γ 9V δ 2 che producono IL-17 presentano un fenotipo T_{EMRA}-like, CD27⁻CD45RA⁺ e, solo una piccola frazione di cellule esprime un fenotipo T_{NAIVE}. Dunque, a differenza dei linfociti T CD8 $\alpha\beta$ IL-17⁺, rappresentati quasi esclusivamente da subsets T_{early} e T_{intermediate} (60), la produzione di IL-17 è limitata ai linfociti T V γ 9V δ 2 con un fenotipo T_{EMRA} (Fig.18A).

I linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ differenziatisi *in vitro* esprimono inoltre il recettore CCR6 (Fig.18A), un recettore per chemochine identificato come un marker delle cellule Th17 umane della memoria, ma non esprimono i recettori CCR3, CCR4, CCR5, CXCR3 e CXCR5. I linfociti T V γ 9V δ 2 IFN- γ ⁺ differenziatisi *in vitro* in condizioni analoghe, mostrano invece un profilo di espressione dei recettori per chemochine che si può definire reciproco rispetto al precedente, dal momento che è rappresentato da una scarsa espressione del recettore CCR6 e da un'elevata espressione dei recettori CXCR3 e CCR5 (Fig.18 A). I linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺, inoltre, esprimono granzyme B, TRAIL e FasL e CD161, ma non esprimono perforina, NKG2D, CD16 e CD56 (Fig.18B).

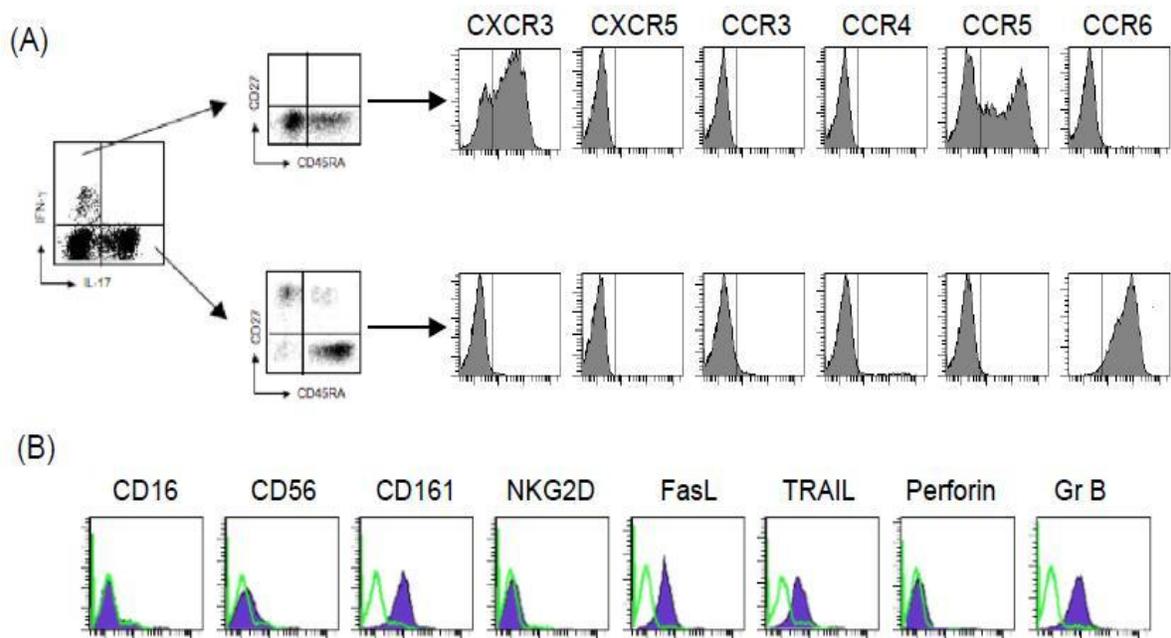


Fig.18 Fenotipo dei linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺. In (A) l'espressione dei recettori per chemochine dei linfociti IL-17⁺ e IFN- γ ⁺. (B) Espressione di markers di superficie ed intracellulari dei linfociti V γ 9V δ 2 IL-17⁺

I linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ inducono la migrazione dei neutrofili e aumentano la loro attività fagocitica: ruolo della chemochina CXCL8.

I linfociti T CD4 Th17 sono in grado di indurre, direttamente o indirettamente, il reclutamento dei neutrofili. Scopo di questo studio è stato quello di analizzare gli effetti dei linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ sulle diverse proprietà dei neutrofili. Abbiamo precedentemente descritto che per verificare la capacità di tali cellule di stimolare la chemiotassi dei neutrofili, è stata utilizzata una camera Boyden nella quale i neutrofili sono stati posizionati nella parte supe-

riore mentre i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ sono stati messi nella parte inferiore della camera. Dopo 3 ore di incubazione, i neutrofili migrati attraverso la membrana, e quindi presenti nella parte inferiore della camera, sono stati colorati e contati. Come mostrato in Fig.19A, i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ attivati sono in grado di indurre una significativa migrazione dei neutrofili, mentre i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ non polarizzati verso la produzione di IL17 non mostravano questa proprietà. Tale capacità inoltre veniva neutralizzata in seguito all'aggiunta nella parte inferiore della camera di un anticorpo monoclonale anti-CXCL8 (Fig.19A).

E' stato inoltre verificato che i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ attivati erano in grado di potenziare la fagocitosi dei granulociti neutrofili. I risultati di 8 diversi esperimenti hanno dimostrato che (Fig.19B), quando incubati in presenza di cellule $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ attivate con IPP, i neutrofili aumentavano la loro capacità di fagocitare microbiglie-PE positive e che tale potenzialità veniva ridotta in seguito all'aggiunta nelle colture di un anticorpo neutralizzante anti-CXCL8. Co-culture di granulociti neutrofili e linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ in assenza di IPP, o con IPP ma in assenza di cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺, non aumentavano la loro attività fagocitica. Nel loro insieme, tali risultati rivelano una nuova proprietà dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ antigene-stimolati, ossia la loro capacità di produrre chemochine (CXCL8) in grado di reclutare i neutrofili, potenziando al tempo stesso la loro attività fagocitica.

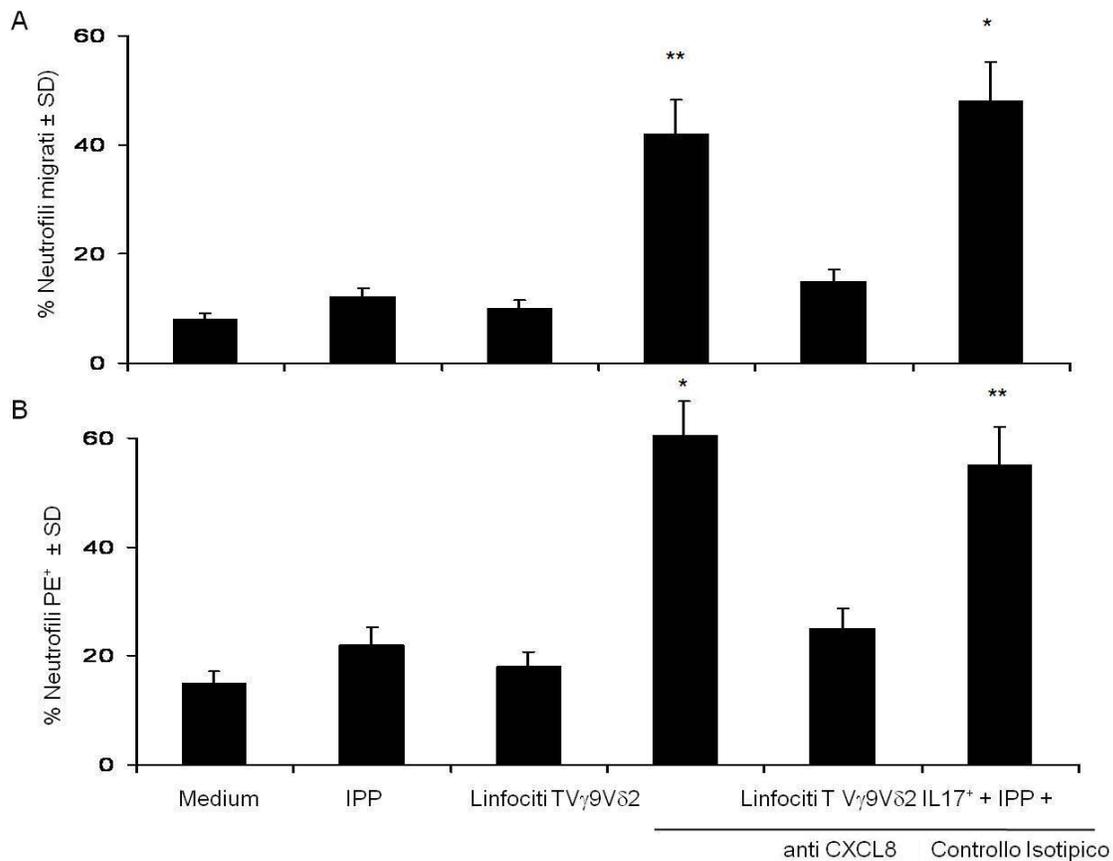


Fig.19 I linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ promuovono (A) la migrazione chemiotattica CXCL-8 mediata dei granulociti neutrofilii e (B) l'attività fagocitica

I linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ up-regolano la produzione di β -defensina da parte di cellule epiteliali.

I linfociti T CD4 Th17 sono in grado di indurre la produzione di proteine e peptidi antibatterici da parte di cellule epiteliali. In questo studio è stato valutato il rilascio di β -defensina da parte di cellule epiteliali messe in coltura in presenza di linfociti T V γ 9V δ 2

IL17⁺. Come mostrato in Fig.20, i linfociti T $\gamma\delta$ IL17⁺ stimolati antigenicamente up-regolano in maniera significativa la produzione di β -defensina da parte di cellule epiteliali, mentre i linfociti T V γ 9V δ 2 non polarizzati verso cellule che producono IL17 non sono in grado di indurre tale produzione. Inoltre, l'aggiunta alle colture di un anticorpo monoclonale anti-IL17 riduce significativamente la capacit  di tale cellule di up-regolare la produzione di β -defensina (Fig.20).

I risultati di tali esperimenti indicano chiaramente che i linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ esplicano diverse funzioni in grado di promuovere la difesa dell'ospite nei confronti di particolari agenti infettivi e di contribuire alla risposta immune a livello delle superfici mucosali.

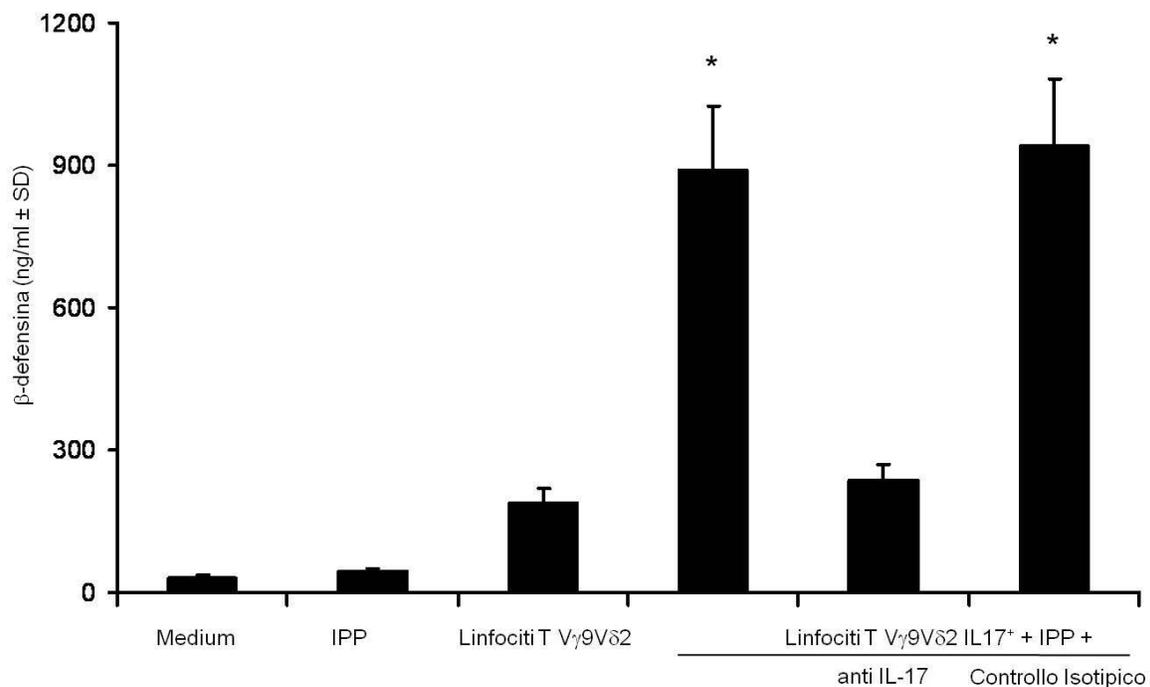


Fig.20 I linfociti T V γ 9V δ 2 inducono la produzione IL-17 dipendente di β -defensina da parte dei cellule epiteliali

Linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ in pazienti con meningite batterica.

E' stato recentemente riportato che i linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ umani possono essere rilevati nel sangue periferico ad una frequenza approssimativamente dell'1% in seguito a stimolazione policlonale di PBMC, sebbene questo dato sia estremamente variabile. In accordo con tale osservazione, abbiamo trovato frequenze molto basse di cellule IL17⁺ tra i linfociti T V γ 9V δ 2 provenienti dal sangue periferico di soggetti sani (30 soggetti esaminati), sia in seguito a breve stimolazione antigenica tramite fosfoantigene che dopo l'uso di anti-CD3 o mitogeno (Fig.21A).

Risulta ormai chiaro che le risposte Th17 sono importanti per la difesa dell'ospite nei confronti di diversi microrganismi, in particolare batteri extracellulari. Allo scopo di capire se durante tali infezioni poteva essere osservata una maggiore frequenza di linfociti T V γ 9V δ 2

IL17⁺, è stato analizzato il sangue periferico di bambini affetti da meningite batterica (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*), prima e dopo terapia che ha dato esito positivo, confrontandolo con il sangue di bambini sani.

Inoltre è stato analizzato il liquido cerebrospinale degli stessi pazienti. Come mostrato in Fig.21A, la frequenza dei linfociti T V γ 9V δ 2 IL17⁺ circolanti era significativamente incrementata ($p < 0.001$) in tutti i pazienti analizzati con meningite batterica rispetto ai controlli sani, ma questo pattern si modificava dopo terapia antibatterica condotta con successo (Fig.21B). Inoltre, il repertorio dei linfociti T $\gamma\delta$ proveniente dal liquido cerebrospinale dei pazienti era caratterizzato da una predominanza di cellule T V γ 9V δ 2 IL17⁺ (Fig.21C) che rappresentavano più del 70% di tutti i linfociti $\gamma\delta$. La presenza di una maggiore percentuale

di linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL17⁺ e la loro localizzazione nel sito attivo della malattia suggerisce che tali cellule potrebbero giocare un ruolo importante nella patogenesi della meningite batterica.

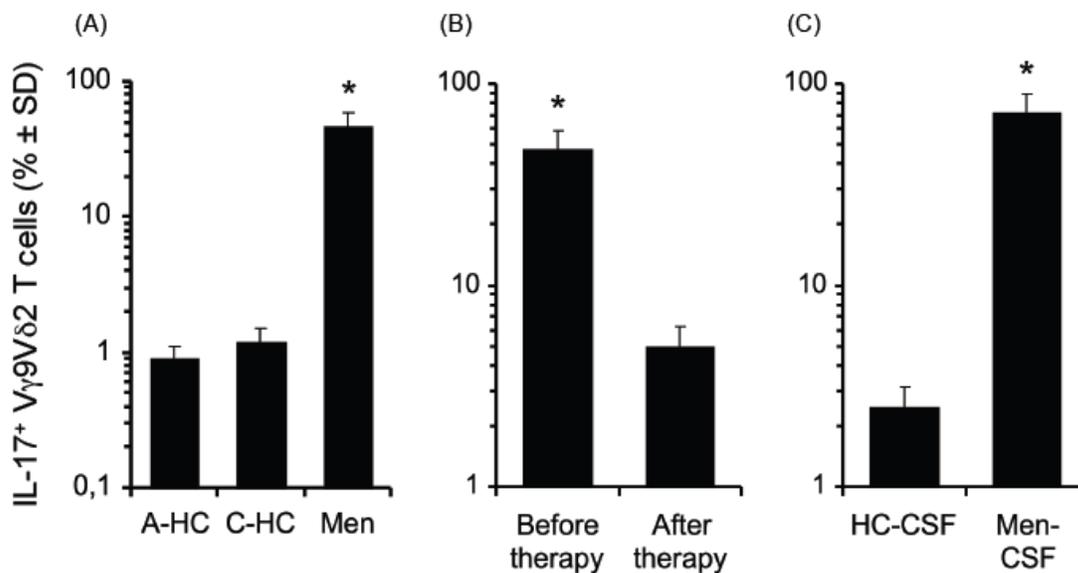


Fig.21 Frequenza dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL-17⁺ nei soggetti controllo e in pazienti con meningite batterica.

Discussione e conclusioni

I linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ mostrano *in vitro* una certa plasticità nello svolgere le loro funzioni, caratteristica che li accomuna ai linfociti T $CD4^+ \alpha\beta$ convenzionali. La stessa popolazione di linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ umani potrebbe quindi, rapidamente e prontamente, esplicare distinte funzioni effettrici, Th1-like, Th2-like e/o T helper B follicolari (T_{FH})-like, suggerendo che tali cellule sono in grado di influenzare profondamente la complessità della risposta immune. I linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ possono inoltre acquisire le caratteristiche di cellule presentanti l'antigene professionali (APC) innescando così le risposte primarie delle cellule $T\alpha\beta$ naive. Analogamente ai linfociti T $CD4^+$, nell'ambito dei quali diversi subsets specializzati influenzano la risposta immune dell'ospite, i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ Th1-like potrebbero promuovere la risposta pro-infiammatoria e l'attività citolitica nelle infezioni o durante la terapia di determinate forme tumorali; i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ Th2-like potrebbero sostenere le risposte umorali nelle infezioni e nelle allergie; i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ T_{FH} -like potrebbero cooperare con i linfociti B nei tessuti linfoidei secondari e controllare l'autoimmunità; i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ APC-like potrebbero avviare le risposte dei linfociti T naive nei tessuti linfoidei e potrebbero essere impiegati nella progettazione di vaccini e nell'immunoterapia; i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ regolatori (Treg)-like potrebbero infine sopprimere le risposte immuni antigene-specifiche.

I risultati di questo lavoro dimostrano che nei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ umani naive, l'espressione di $ROR\gamma t$ e la polarizzazione verso la produzione di IL-17 vengono efficacemente indotte dalla stimolazione specifica del TCR tramite fosfoantigene in presenza di una combinazio-

ne di citochine polarizzanti, IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-23, e di ligandi per il recettore arilico. Tali cellule esprimono un fenotipo terminalmente differenziato effector memory-like caratterizzato dall'espressione della molecola CD45RA in assenza del CD27. Dunque, a differenza dei linfociti T CD8 $\alpha\beta$ IL-17⁺, quasi esclusivamente rappresentati da subsets T_{early} e T_{intermediate} (60), la produzione di IL-17 da parte dei linfociti T V γ 9V δ 2 è attribuibile a cellule con fenotipo T_{EMRA}-like.

I linfociti V γ 9V δ 2 T_{EMRA} sono stati inizialmente identificati nel liquido ascitico e cerebrospinale di pazienti tubercolotici e considerati come cellule che raggiungono lo stadio più avanzato del loro differenziamento a seguito di una progressiva e ristretta selezione delle cellule effettrici e, considerata (a) l'espressione da parte loro di CD16, CD56 e recettori NK attivatori, (b) il loro elevato contenuto in granzimi, granzulina e perforina, (c) la loro spiccata capacità di riconoscere e lisare cellule tumorali e (d) la ridotta capacità di produrre TNF- α e IFN- γ , tali cellule rappresentano un pool distinto di cellule effettrici citotossiche altamente competenti all'interno della popolazione T linfocitaria (61). Comunque, con i nostri esperimenti abbiamo dimostrato che esistono significative differenze fenotipiche tra i linfociti citotossici V γ 9V δ 2 T_{EMRA} precedentemente descritti e la popolazione cellulare V γ 9V δ 2 IL17⁺ dal momento che, quest'ultima, esprime granzyme B, TRAIL, FasL e CD161 ma manca dell'espressione di perforina, NKG2D, CD16. La perdita di espressione di perforina, in presenza di granzyme B, è una caratteristica peculiare ma non unica di queste cellule dal momento che è stata precedentemente descritta nel compartimento dei linfociti T CD8 correlandola all'assente o ridotta attività citolitica. In accordo con questa affermazione, sia i linfociti T CD8 $\alpha\beta$ IL17⁺ umani che murini, mancano dell'espressione sia di perforina che di granzyme B, quindi dell'attività citolitica, sebbene studi recenti hanno dimostrato che le cellule Tc17 murine sono in grado di

mediare l'immunità ai virus tramite l'acquisizione di una potenziale attività citolitica correlata all'espressione di FasL (62).

In maniera analoga, la popolazione T $V\gamma 9V\delta 2$ IL-17⁺ qui descritta esprime FasL, ed è in grado di esercitare una potente attività citotossica TRAIL-mediata nei confronti di cellule epiteliali tumorali (dati non pubblicati); altre indagini si ritengono comunque necessarie al fine di comprendere la relazione esistente tra i T $V\gamma 9V\delta 2$ IL-17⁺ e le cellule citotossiche $V\gamma 9V\delta 2$ T_{EMRA} convenzionali, e di chiarirne il ruolo funzionale.

L'espressione del CD161 da parte dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL-17⁺ è in accordo con la scoperta che tale molecola rappresenta un marker delle cellule produttrici di IL-17 (63). CD161 (o NKRP1A) è l'omologo umano dell'NK1.1 murino (64), ed è espresso nella maggior parte delle cellule NK ed NKT (65-66), ma anche da parte di tutti i linfociti circolanti, inclusi i linfociti T $\gamma\delta$, in grado di produrre IL-17, così come nei precursori dei linfociti T IL-17⁺, questo aspetto è almeno in parte RORC2-dipendente (67). L'espressione di CD161 è stata precedentemente riscontrata sui linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$, ma lo stadio differenziativo e la capacità delle cellule CD161⁺ di secernere citochine e di esplicare l'attività citotossica non è stata analizzata. Dato interessante è rappresentato dal fatto che le cellule $V\gamma 9V\delta 2$ CD161⁺ sono fortemente espanse in pazienti affetti da Sclerosi Multipla, scoperta che ha reso possibile ipotizzare un coinvolgimento dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ IL-17⁺ nella risposta effettrice responsabili delle malattie infiammatorie autoimmuni.

Utilizzando l'espressione di recettori per chemochine come markers aggiuntivi per l'identificazione dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ differenziati in cellule che producono IL-17, i risultati di questo studio hanno messo in evidenza che questo subset linfocitario è caratterizzato

dall'espressione selettiva del recettore CCR6, una molecola precedentemente identificata come marker dei linfociti Th17 umani della memoria. Inoltre, a differenza delle cellule Th1-like, i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IFN-\gamma^+$ esprimono in maniera caratteristica i recettori CXCR3 e CCR5 ma presentano bassi livelli di espressione del recettore CCR6, mentre i linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IL-4^+IL-10^+$ T_{FH} -like esprimono selettivamente il recettore CXCR5 ma perdono l'espressione del recettore CCR6.

Quindi, l'espressione di markers caratteristici del programma Th17 (ROR γ t, IL-17, CCR6 e la richiesta di un mezzo di coltura ricco in aminoacidi aromatici per l'attivazione del recettore arilico) nei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IL-17^+$ rafforza il concetto che esiste, nella differenziazione di tali cellule, una regolazione coordinata delle loro capacità migratorie e delle loro funzioni effettrici. E' inoltre importante sottolineare il fatto che la molecola CCL20, agonista del CCR6, costitutivamente espressa a livello dei tessuti epidermici normali e associati alla mucosa, è up-regolata dall'azione dell'IL-17 (68) ed è in grado di mediare il reclutamento dei linfociti T e delle cellule dendritiche nei tessuti infiammati. I linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ $IL-17^+$ inducono quindi la rapida produzione IL17-dipendente di β -defensina da parte delle cellule epiteliali, un'altra molecola agonista del CCR6 (68-70), il reclutamento CXCL-8 dipendente dei neutrofili e l'up-regolazione della loro attività fagocitica.

In definitiva, l'IL-17 prodotta dai linfociti $V\gamma 9V\delta 2$ circolanti potrebbe innescare un loop positivo in grado di richiamare i linfociti Th17 e Th1, insieme alle cellule dendritiche e i neutrofili, cellule cioè che amplificano ulteriormente le risposta infiammatoria dell'ospite.

Precedenti studi condotti sui topi hanno dimostrato che i linfociti $T\gamma\delta$ rappresentano una sorgente innata di IL-17; in particolare, in seguito ad infezione da *M. tuberculosis* o da ife

di *Candida albicans*, da BCG del *M. bovis*, da *L. monocytogenes*, da *E. coli* e da *Salmonella enterica* (71) o con agonisti del TLR2, i linfociti T $\gamma\delta$ producono rapidamente IL-17 in risposta all'ambiente citochinico o ai patogeni senza l'impegno del TCR. Una diretta conseguenza di queste osservazioni è data dal fatto che il ruolo del TCR nella produzione di IL-17 da parte dei linfociti T $\gamma\delta$ potrebbe essere ridondante a livello dello sviluppo T cellulare, in accordo con l'esistenza di un loro fenotipo predeterminato nel timo senza che avvenga una selezione positiva o negativa mediata dal TCR. Sembra, infatti, che i linfociti T $\gamma\delta$ murini acquisiscano la potenziale capacità di produrre IL-17A nel timo neonatale (71) e, almeno nel modello antigenico T10/T22, questo non dipende da una specifica stimolazione antigenica avvenuta nel timo (72).

Le analisi condotte in questo studio, a differenza di ciò che è stato riscontrato nel modello murino, hanno invece messo in evidenza che nella differenziazione dei linfociti V γ 9V δ 2 in cellule che producono IL-17 è necessario l'impegno recettoriale del TCR, quindi, il subset individuato nel corso di questa ricerca è confinato nell'ambito delle cellule effettrici della memoria terminalmente differenziate. Il chiarimento riguardante il ruolo dell'ambiente citochinico, l'attivazione TCR-dipendente o indipendente dei linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ umani e il loro coinvolgimento nell'ambito della risposta immune protettiva o nella patogenesi è, in definitiva, uno strumento conoscitivo di grande importanza ai fini di un loro potenziale uso nell'immunoterapia.

Nonostante risulti sempre più chiaro il fatto che i linfociti T effettrici sono estremamente eterogenei in termini di produzione di citochine, i risultati dei nostri esperimenti hanno dimostrato che, in seguito alla stimolazione antigenica condotta *in vitro*, i linfociti T V γ 9V δ 2 IL-

17⁺ non producono né IL-22 né IFN- γ . Comunque, in contrasto con i nostri risultati, i dati pubblicati in un recente studio hanno dimostrato che questo subset cellulare produce anche IL-22 e/o IFN- γ (55), mentre le cellule in grado di produrre soltanto IL-17 vengono riscontrate raramente. Questa osservazione è in accordo con il presupposto che i linfociti T polarizzati in un senso, sebbene mantengano la memoria dell'input conferito dalle citochine, potrebbero subire un ulteriore differenziamento in risposta a nuovi stimoli (73, 74). Alternativamente è anche possibile che alcuni linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ siano già programmati per differenziarsi in cellule che producono IL-22 e/o IFN- γ , dal momento che questo è stato osservato anche per le cellule pre-commissionate a differenziarsi in senso Th1 o Th2 (75). Il commissionamento, e allo stesso tempo la flessibilità delle celle T effettrici, sono probabilmente controllati dall'espressione bilanciata dei fattori di trascrizione linea-specifici (76). E' dunque possibile che in determinate condizioni di stimolazione antigenica, o in un determinato microambiente citochinico, o a causa dell'influenza esercitata da entrambi i fattori, i linfociti T V γ 9V δ 2 possano differenziarsi in cellule multifunzionali in grado di integrare le risposte innescate in periferia con meccanismi aggiuntivi.

Risulta ormai chiaro che le risposte Th17 sono importanti per la difesa dell'ospite nei confronti di diversi microrganismi ed in particolare tali cellule sono significativamente aumentate in pazienti con meningite batterica rispetto ai controlli sani, e questo andamento cambia in seguito a terapia antibatterica eseguita con successo. Inoltre, la considerazione più importante è data dal fatto che nel liquido cerebrospinale di questi pazienti le cellule IL-17⁺ rappresentavano la popolazione V γ 9V δ 2 predominante. La maggiore percentuale di linfociti T V γ 9V δ 2 IL-17⁺ e la loro localizzazione nel sito attivo

della malattia suggerisce quindi che tali cellule potrebbero giocare un ruolo importante nella risposta infiammatoria che si

instaura nel corso della meningite batterica.

In conclusione, i dati riportati in questo lavoro enfatizzano e confermano la ormai ben conosciuta plasticità dei linfociti T $V\gamma 9V\delta 2$ riguardo la loro capacità di esplicare differenti funzioni effettrici in base all'influenza esercitata dal microambiente citochinico.

Una migliore comprensione delle modalità di differenziazione e polarizzazione delle cellule $V\gamma 9V\delta 2$ $IL-17^+$ potrebbe essere molto utile ai fini di applicazioni terapeutiche nel contesto di patologie dove le risposte immuni protettive sono necessarie nei confronti di patogeni infettivi o nell'ambito di patologie tumorali, o allo scopo di inibire risposte infiammatorie indesiderate come quelle che si verificano nel corso di malattie autoimmuni.

Bibliografia

1. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):652-7.
2. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41.
3. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;114(6):1265-73.
4. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76.
5. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:160-71.
6. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Apr;14(2):155-74.
7. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998 Apr 1;160(7):3513-21
8. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce

- proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2593-603.
9. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):2347-52.
10. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol*. 2002 Jan;71(1):1-8. Review.
11. Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17A and interleukin-17F: a tale of two cytokines. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):9-11.
12. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1051-7. Review
13. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med*. 2009 May;87(5):451-4. Review
14. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jul 17;454(7202):350-2.
15. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1345-52
16. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den Berg W, Miossec P. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2001;3(3):168-77.
17. Garrett-Sinha LA, John S, Gaffen SL. IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Sep;20(5):519-25.

18. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol*. 2008 Jun;127(3):385-93.
19. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, Krueger JG. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008 May;128(5):1207-11.
20. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1998 Oct;111(4):645-9.
21. Graber JJ, Allie SR, Mullen KM, Jones MV, Wang T, Krishnan C, Kaplin AI, Nath A, Kerr DA, Calabresi PA. Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2008 May 30;196(1-2):124-32. Epub 2008 Apr 16.
22. O'Brien RL, Roark CL, Born WK. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):662-6. *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5167-71.
23. Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, Luger D, Nussenblatt RB, Caspi RR. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR-gamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5167-71.
24. Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, Lochner M, Schneider E, Dy M, Eberl G, Leite-de-Moraes MC. Critical role of ROR-gamma in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19845-50.
25. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZH. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J*

Immunol. 2008 Nov 1;181(9):6117-24

26. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2106-12

27. Kapsenberg ML. Gammadelta T cell receptors without a job. *Immunity.* 2009 Aug 21;31(2):181-3.

28. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235-8.

29. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 15;90(2):770-4.

30. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):950-7.

31. Stockinger B, Veldhoen M, Hirota K. Modulation of Th17 development and function by activation of the aryl hydrocarbon receptor--the role of endogenous ligands. *Eur J Immunol.* 2009 Mar;39(3):652-4.

32. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol.* 2009 Nov;47(1):3-7.

33. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17

- production. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4466-72.
34. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):25-31.
35. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, Fournié JJ. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* 1994 Apr 8;264(5156):267-70.
36. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):155-8.
37. Jomaa H, Feurle J, Lühs K, Kunzmann V, Tony HP, Herderich M, Wilhelm M. Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Sep;25(4):371-8.
38. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 16;91(17):8175-9.
39. Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, Beck E, Wiesner J, Eberl M, Jomaa H. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2001 Dec 7;509(2):317-22.
40. Wang H, Lee HK, Bukowski JF, Li H, Mariuzza RA, Chen ZW, Nam KH, Morita CT. Conservation of nonpeptide antigen recognition by rhesus monkey V gamma 2V delta 2 T cells. *J Immunol.* 2003 Apr 1;170(7):3696-706.

41. Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournié JJ, Goldman M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol.* 2002 Jun;103 (3 Pt 1):296-302.
42. Brandes M, Willimann K, Lang AB, Nam KH, Jin C, Brenner MB, Morita CT, Moser B. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3693-701.
43. Poccia F, Gougeon ML, Agrati C, Montesano C, Martini F, Pauza CD, Fisch P, Wallace M, Malkovsky M. Innate T-cell immunity in HIV infection: the role of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes. *Curr Mol Med.* 2002 Dec;2(8):769-81.
44. Salerno A, Dieli F. Role of gamma delta T lymphocytes in immune response in humans and mice. *Crit Rev Immunol.* 1998;18(4):327-57.
45. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, Glass D, Strominger JL, Brenner MB. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med.* 1990 May 1;171(5):1597-612.
46. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
47. Born WK, Jin N, Aydintug MK, Wands JM, French JD, Roark CL, O'Brien RL. gamma-delta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? *J Clin Immunol.* 2007 Mar;27(2):133-44.
48. Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1989 May 12;244(4905):713-6.
49. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U*

S A. 1994 Aug 16;91(17):8175-9.

50. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, Angelini D, Borsellino G, Poccia F, Battistini L, Dieli F, Salerno A. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1764-72.

51. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis.* 2001 Oct 15;184(8):1082-5.

52. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med.* 2003 Aug 4;198(3):391-7.

53. Peng MY, Wang ZH, Yao CY, Jiang LN, Jin QL, Wang J, Li BQ. Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell Mol Immunol.* 2008 Jun;5(3):203-8.

54. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6611-8.

55. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol.* 2010 Jun 15;184(12):7268-80.

56. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp*

Med. 1995 Aug 1;182(2):389-400.

57. Tanaka S, Edberg JC, Chatham W, Fassina G, Kimberly RP. Fc gamma RIIIb allele-sensitive release of alpha-defensins: anti-neutrophil cytoplasmic antibody-I induced release of chemotaxins. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6090-6.

58. Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT, Liao KK, Li C. CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Jan 1;41(1):6-16.

59. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med*. 2003 Aug 4;198(3):391-7.

60. Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):1794-8.

61. Caccamo N, Sireci G, Meraviglia S, Dieli F, Ivanyi J, Salerno A. gammadelta T cells condition dendritic cells in vivo for priming pulmonary CD8 T cell responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 2006 Oct;36(10):2681-90.

62. Yeh N, Glosson NL, Wang N, Guindon L, McKinley C, Hamada H, Li Q, Dutton RW, Shrikant P, Zhou B, Brutkiewicz RR, Blum JS, Kaplan MH. Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2089-98.

63. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi E, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Fambrini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1903-16.

64. Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* 1994 Sep 15;153(6):2417-28.
65. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:297-336.
66. Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jul;7(7):505-18.
67. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells? *Eur J Immunol.* 2009 Mar;39(3):637-40.
68. Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):6676-85.
69. Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3482-91.
70. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):525-8.
71. Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, Yamasaki S, Steinman L, Saito T, Locksley RM, Davis MM, Baumgarth N, Chien YH. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity.* 2008 Jul 18;29(1):90-100.

72. Jensen KD, Chien YH. Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):140-5.
73. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849-61.
74. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol.* 2003 Jan;4(1):78-86.
75. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med.* 2004 Sep 20;200(6):725-35.
76. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):25-31. Review.