

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA

IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

XXVII CICLO

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

**Ruolo delle cellule T helper follicolari (Tfh) nella risposta
immunitaria e nelle malattie allergiche**

Tutor

**Ch.mo
Prof. Gianni Marone**

CANDIDATA

Dott.^{SSA} Gilda Varricchi

Ringraziamenti

Desidero esprimere il mio più sincero ringraziamento al Professore Stephen R. Durham, Direttore della *Division of Allergy and Clinical Immunology (ACID), Imperial College London-National Heart and Lung Institute (NHLI)*, per avermi offerto la possibilità ed il privilegio di lavorare presso la sua struttura di eccellenza e per avermi consentito di sviluppare una tematica di avanguardia in ambito allergologico ed immunologico clinico. Un sentito ringraziamento al Dr. Mohamed H. Shamji, Direttore *dell'Immunomodulation and Tolerance Network (ITN), Allergy and Clinical Immunology-Imperial College London* per l'addestramento e la preziosa supervisione nel suo laboratorio. Un ringraziamento speciale al Dr. Guy W. Scadding per gli inestimabili insegnamenti clinici e metodologici e per la disponibilità e pazienza costantemente mostrate durante il mio soggiorno londinese. Grazie a Rebecca V. Parkin e Natalia Couto Francisco per la qualificata assistenza in laboratorio; al Dr. Mongkol Lao-Araya ed alla Dott.ssa Esther Steveling per il prezioso aiuto nel reclutamento dei pazienti. *Last but not least*, un particolare ringraziamento al Professore Gianni Marone, Tutor in questo percorso formativo, che mi ha accolta nel suo gruppo consentendomi di realizzare questo progetto sperimentale.

INDICE

I.	INTRODUZIONE	Pag. 5
II.	MIGRAZIONE E LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE TFH	Pag. 10
III.	FUNZIONE DELLE CELLULE TFH E DELL'IL-21	Pag. 12
IV.	CELLULE TFH-LIKE DEL SANGUE PERIFERICO UMANO	Pag. 15
V.	LE CELLULE T_{FH}-LIKE E LE CELLULE TREG FOLLICOLARI	Pag. 22
VI.	IL-21 ED IL RECETTORE IL-21R	Pag. 24
VII.	IL-21 E LE CELLULE TFH NELLE MALATTIE ALLERGICHE	Pag. 26
VIII.	MATERIALI E METODI	Pag. 33
	1) SKIN PRICK TESTS E IMMUNOCAP®	Pag. 33
	2) ISOLAMENTO DELLE PBMCs (PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS) DAL SANGUE PERIFERICO	Pag. 33
	3) ISOLAMENTO DEI B LINFOCITI	Pag. 34
	4) ISOLAMENTO DELLE PLASMACELELLE	Pag. 36

5)	STIMOLAZIONE DELLA PRODUZIONE DI IGE	Pag. 36
6)	VALUTAZIONE DEI LINFOCITI T CD4 ⁺ , CXCR5 ⁺ , IL-21 ⁺ , PD1 ⁺ DEL SANGUE PERIFERICO ATTRAVERSO CITOFLUORIMETRIA	Pag. 37
7)	VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI CELLULE ESPRIMENTI MRNA PER LA IL-21	Pag. 37
8)	ANALISI STATISTICA	Pag. 37
IX.	RISULTATI	Pag. 38
X.	CONCLUSIONI	Pag. 40
XI.	OPEN QUESTIONS	Pag. 41
XII.	BIBLIOGRAFIA	Pag. 44
XIII.	LEGENDA DELLE FIGURE	Pag. 68
XIV.	FIGURE	Pag. 78

I. INTRODUZIONE

La produzione di anticorpi da parte delle plasmacellule è una fondamentale prerogativa dell'immunità adattativa. Gli anticorpi delle classi IgM, IgG ed IgA diretti contro epitopi batterici e virali neutralizzano i microrganismi proteggendo l'organismo dalle infezioni batteriche (Tangye *et al.*, 2013). Gli anticorpi della classe IgE sono prodotti in risposta ad infezioni da elminti e ad un ampio spettro di allergeni. Infatti, le IgE svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi delle malattie allergiche (Wu e Zarrin, 2014). L'induzione dell'immunità protettiva contro agenti patogeni e la produzione di IgE in risposta ad allergeni dipende da distinti tipi di risposte immunitarie. Questo concetto si basa sulla flessibilità e sulla plasticità dei T linfociti *naïve* CD4⁺ che possono differenziarsi in diversi sottopopolazioni con funzioni effettrici specializzate. La differenziazione dei vari *subsets* di cellule T è influenzata dalle citochine presenti nel microambiente che inducono la sintesi di specifici fattori di trascrizione che, a loro volta, attivano i linfociti CD4⁺ verso la differenziazione in specifiche linee cellulari (Fig.1).

La differenziazione dei B linfociti a plasmacellule dipende fondamentalmente da segnali provenienti da linfociti T *helper* follicolari (Tfh) (Tangye *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Le cellule Tfh, inizialmente individuate, nel 2000 e nel 2001, nelle tonsille umane da tre gruppi indipendenti di ricercatori, rappresentano una sottopopolazione di linfociti

T *helper* con una particolare espressione di profilo genico ed una particolare attitudine a stimolare la risposta anticorpale. I linfociti T *helper* follicolari (Tfh) rappresentano una sottopopolazione di T linfociti CD4⁺ caratterizzata fenotipicamente da elevati livelli del recettore per le chemochine CXCR5 (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

Le tonsille sono organi linfatici secondari simili ai linfonodi e sono esposte ad un ampio spettro di antigeni di origine batterica e virale provenienti dall'orofaringe e dalle alte vie respiratorie. Le tonsille possiedono ampi ed attivi centri germinativi e rappresentano, pertanto, organi linfatici ideali per lo studio delle funzioni degli stessi. I centri germinativi sono strutture che si sviluppano all'interno della zona B cellulare (follicoli) dei tessuti linfoidei secondari. Il complesso processo di maturazione dei linfociti B (selezione clonale ed ipermutazione), lo *switching* isotipico, la maturazione delle cellule B della memoria ed in plasmacellule si verificano all'interno dei centri germinativi. Pertanto, i centri germinativi svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità protettiva contro i patogeni batterici e virali e verosimilmente nella produzione di IgE.

L'espressione del recettore CXCR5 caratterizza fenotipicamente le cellule Tfh dagli altri linfociti T CD4⁺. Il recettore per le chemochine CXCL13 regola la migrazione delle cellule Tfh verso le zone B dei follicoli (Kim *et al.*, 2001; Ansel *et al.*, 1999). CXCR5 è altamente espresso sulle Tfh presenti nei centri germinativi. Questo recettore è anche presente sulla superficie dei linfociti B ed è necessario

per la loro risposta a CXCL13 e per la migrazione a formare follicoli (Förster *et al.*, 1996). La co-localizzazione delle cellule T CD4⁺ e delle cellule B all'interno dei follicoli permette l'interazione tra il T *cell receptor* (TCR) ed il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di classe II (TCR-MHCII) espresso dalle cellule dendritiche. Numerose altre molecole di superficie (CD28, CD40L, ICOS, PD-1, etc.) sono fondamentali per un'ottimale interazione cellulare tra linfociti Tfh e linfociti B.

L'originale descrizione delle cellule Tfh in funzione dell'espressione di CXCR5 fu inizialmente insufficiente a caratterizzarle con precisione. Infatti, inizialmente la letteratura scientifica non le riconobbe pienamente come un subset di cellule T CD4⁺ distinto dalle altre sottopopolazioni di linfociti T *helper* (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Treg). La differenziazione dei linfociti CD4⁺ è controllata da fattori di trascrizione che determinano la differenziazione in linfociti Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, ed in Treg (T-bet, GATA3, PU-1, ROR γ t, AHR/ROR γ t, Foxp3, rispettivamente) (Zhu *et al.*, 2010).

Inizialmente non fu identificato alcun fattore di trascrizione nei linfociti Tfh umani. La successiva identificazione di BCL-6 come il principale regolatore della differenziazione dei linfociti Tfh (Johnston *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009), ha fornito la dimostrazione del ruolo “*helper*” di queste stesse cellule nei confronti dei linfociti B (Johnston *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2008).

Inoltre, la comprensione dell'importanza di IL-21 per le funzioni delle cellule Tfh (Nurieva *et al.*, 2008; Linterman *et al.*, 2010; Zotos *et al.*, 2010; Avery *et al.*, 2010) ha permesso di stabilire che questi linfociti sono un subset cellulare distinto di T linfociti CD4⁺ di importanza fondamentale per l'immunità protettiva e, verosimilmente, per la sintesi di IgE (Fig. 1).

Il ruolo fondamentale delle cellule Tfh e dell'IL-21 nell'immunità umorale è stato dimostrato in diverse malattie infettive, (Cubas *et al.*, 2013; Pallikkuth *et al.*, 2012), in numerose malattie autoimmuni (Simpson *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2011), in corso delle vaccinazioni (Pallikkuth *et al.*, 2012; Bentebibel *et al.*, 2013), in pazienti con immunodeficienze (Harker *et al.*, 2013; Salzer *et al.*, 2014) e nei tumori (Gu-Trantien *et al.*, 2013).

Le cellule Tfh svolgono un ruolo essenziale nella produzione di anticorpi protettivi. Questo aspetto è evidenziato da ricorrenti infezioni in pazienti con immunodeficienze primitive legate a mutazioni di molecole fondamentali per la differenziazione delle cellule Tfh (King *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2013). D'altro canto, una eccessiva o disregolata attività delle cellule Tfh può dar luogo alla iperproduzione di auto-anticorpi ed alla insorgenza di malattie autoimmuni (Craft *et al.*, 2012; Yu and Vinuesa, 2010a; Sweet *et al.*, 2012).

Il ruolo delle cellule Tfh, attraverso la produzione di IL-21, nel guidare la differenziazione delle plasmacellule e la sintesi di IgM, IgG ed

IgA dalle cellule B nei centri germinativi è stato ampiamente documentato. Viceversa, nonostante l'importanza della risposta IgE nella patogenesi delle patologie allergiche (Martinez and Vercelli 2013; Wu and Zarrin, 2014), il ruolo delle cellule Tfh “canoniche”, delle cellule Tfh-like periferiche e dell'IL-21 nelle malattie allergiche resta in gran parte sconosciuto. Gli studi effettuati sinora evidenziano la complessità del ruolo dell'IL-21 nella regolazione della sintesi delle IgE in differenti modelli animali *in vitro* ed *in vivo*.

Numerose lavori hanno valutato le caratteristiche principali delle cellule Tfh (Crotty, 2011; Vinuesa and Cyster, 2011; Linterman *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012; Tangye *et al.*, 2013) e dell'IL-21 (Spolski *et al.*, 2008) nelle patologie autoimmuni, nelle infezioni e nei tumori. Al contrario, il ruolo delle cellule Tfh e dell'IL-21 nella modulazione della sintesi delle IgE nel contesto delle patologie allergiche è stato poco studiato.

Nel nostro studio effettuato presso l'Imperial College London-National Heart and Lung Institute (Allergy and Clinical Immunology Department) diretto dal Prof. Stephen R. Durham e con la supervisione del Dr. Mohamed H. Shamji, abbiamo valutato il ruolo dei linfociti Tfh-like presenti nel sangue periferico in pazienti affetti da rinite allergica stagionale. Inoltre, abbiamo investigato il ruolo della IL-21, citochina prodotta principalmente dai linfociti Tfh e potente *driver* della

differenziazione plasmacellulare, nella produzione di anticorpi IgE dalle cellule B e dalle plasmacellule umane.

II. MIGRAZIONE E LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE TFH

L'interazione tra cellule Tfh e cellule B è stata inizialmente descritta per le cellule Tfh residenti nelle tonsille umane (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Negli ultimi anni vi è un progressivo interesse sull'importanza di differenti subsets di cellule Tfh presenti nel sangue umano (Morita *et al.*, 2011; Bentebibel *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Locci *et al.* 2013). Inoltre, è stata rilevata la presenza di centri germinativi in organi linfatici "terziari": ad esempio nel cervello di pazienti affetti da sclerosi multipla (Magliozzi *et al.*, 2007), nella membrana sinoviale di pazienti con artrite reumatoide (Humby *et al.*, 2009) e nel rene di pazienti con lupus eritematoso sistemico (Chang *et al.*, 2011).

Molteplici progressi sono stati effettuati nella comprensione della migrazione delle cellule B negli organi linfatici secondari ed al loro interno, inclusi i centri germinativi. Tuttavia, non è ben noto cosa determini la migrazione delle cellule Tfh, la loro permanenza e l'uscita dai centri germinativi (Vinuesa and Cyster, 2011; Shulman *et al.*, 2013). La maturazione delle cellule T in aree specializzate all'interno dei follicoli inizia con la migrazione delle cellule T "primed" ai confini tra le

cellule T e i follicoli (T:B *border*) negli organi linfatici secondari (Vinuesa *et al.*, 2011). L'*homing* delle cellule follicolari da parte delle cellule T si basa su processi che iniziano con la *down-regulation* dell'espressione di CCR7. L'allontanamento dalla zona T si verifica contestualmente all'induzione dell'espressione di CXCR5 che è una molecola fondamentale per l'*homing* delle cellule Tfh attraverso il legame con CXCL13 (Haynes *et al.*, 2007). In questo modo, le cellule Tfh maturano e si localizzano all'interno dei centri germinativi attivi. La *down-regulation* di CCR7 e la *up-regulation* di CXCR5 è coordinata dal fattore di trascrizione BCL-6 (Johnstone *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2009a). Recentemente, è stato riportato che Ascl2 è un altro fattore di trascrizione precedente all'induzione di BCL-6 ed ha un ruolo fondamentale nella *up-regulation* iniziale di CXCR5 e la *down-regulation* di CCR7 innescate dal *signaling* del TCR (Liu *et al.*, 2014). Inoltre, l'ubiquitina E₃ ligasi *Itch* sembra avere un ruolo importante nelle fasi iniziali dello sviluppo delle cellule Tfh (Xiao *et al.*, 2014). D'altro canto STAT5 regola negativamente la maturazione delle Tfh e le loro funzioni attraverso la riduzione di CXCR5 e l'espressione di IL-21 (Nurieva *et al.*, 2012).

Recentemente numerosi gruppi hanno posto in evidenza la regolazione post-trascrizionale delle cellule Tfh da parte del cluster di micro-RNA miR-17~92 (Baumjohann *et al.*, 2013) e delle proteine della famiglia di *Roquin* (Vogel *et al.*, 2013; Pratama *et al.*, 2013).

III. FUNZIONE DELLE CELLULE TFH E DI IL-21

Una funzione fondamentale dei linfociti Tfh è quella di fornire “*help*” ai linfociti B attraverso la produzione di IL-21 e l’espressione di CD40L. Le cellule Tfh residenti nei centri germinativi possono essere distinte dalle cellule “non Tfh” sulla base della produzione di specifiche citochine (Yu and Vinuesa., 2010). IL-21 è altamente espressa dalle cellule Tfh (Nurieva *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2010; Chtanova *et al.*, 2004; Rasheed *et al.*, 2006). I linfociti Tfh presenti nelle tonsille umane sono i maggiori produttori di IL-21. Viceversa, queste cellule non producono IL-17 e IL-22 (Ma *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). Le cellule Tfh aumentano nel contesto di infezioni virali od elmintiche e possono produrre IFN γ e IL-4 (King and Mohrs, 2009; Reinhardt *et al.*, 2009; Yusuf *et al.*, 2010; Glatman Zaretsky *et al.*, 2009). Tuttavia, l’espressione di queste citochine è di gran lunga inferiore rispetto alle cellule Th1 e Th2 (Ma *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Yusuf *et al.*, 2010). IL-21 è stata inizialmente clonata come il ligando del recettore orfano, IL-21R (Parrish-Novak *et al.*, 2000). IL-21R agisce attraverso l’interazione con la catena gamma (γ_c), facendo dell’IL-21 un membro della famiglia delle citochine γ_c (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21) (Fig. 2).

L’interazione tra le cellule Tfh e le cellule B è complessa e bidirezionale (Fig. 3). Le cellule Tfh sono necessarie alla formazione ed

al mantenimento dei centri germinativi ed alla generazione della maggior parte delle cellule B della memoria e delle plasmacellule. Affinchè la formazione dei centri germinativi abbia inizio, le cellule Tfh inducono la differenziazione delle cellule B dei centri germinativi stimolando l'espressione di BCL-6 nelle cellule B. L'induzione di BCL-6 nelle cellule B è un processo complesso e non completamente elucidato (Parekh *et al.*, 2008). Quando il centro germinativo si è formato, le cellule Tfh provvedono alla sopravvivenza cellulare e ad inviare segnali di proliferazione alle cellule B, stimolando i processi di mutazione ipersomatica e di selezione. Le cellule Tfh forniscono segnali di sopravvivenza e proliferazione alle cellule B attraverso molteplici meccanismi che coinvolgono IL-21, CD40L, PD-1 e BAFF. I prodotti di queste reazioni nei centri germinativi sono rappresentati da cellule della memoria e dalla sintesi di anticorpi ad alta affinità (Fig.4).

IL-21 è il più potente *driver* di differenziazione plasmacellulare sia nell'uomo che nel topo (Ozaki *et al.*, 2004) (Ettinger *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2006; Bryant *et al.*, 2007). L'induzione dell'IL-21 è STAT3 dipendente (Avery *et al.*, 2010). IL-21 è fondamentale anche per la proliferazione dei linfociti B presenti nei centri germinativi (Linterman *et al.*, 2010; Zotos *et al.*, 2010).

Le cellule Tfh esprimono in maniera selettiva un ampio range di marcatori di superficie. Questo riflette due importanti caratteristiche delle Tfh: la localizzazione selettiva che richiede l'espressione del

recettore CXCR5 per alcune specifiche citochine e la capacità di fornire “help” alle cellule B. Il CD40 appare fondamentale in numerosi steps ed aspetti dell’ “help” alle cellule B. In assenza di CD40L o CD40, vi è un blocco a livello dei centri germinativi (Foy *et al.*, 1994) e dello sviluppo plasmacellulare (Renshaw *et al.*, 1994). Le cellule B dei centri germinativi sono altamente pro-apoptotiche e richiedono costanti segnali per la loro sopravvivenza (Allen *et al.*, 2007). Il legame CD40L-CD40 è critico per il mantenimento delle cellule B (Takahashi *et al.*, 1998). La proliferazione richiede la presenza di CD40L e di IL-21 (Good *et al.*, 2006).

IL-4 è il prototipo delle citochine Th2 ed è associata alla produzione di anticorpi IgE (Johnston *et al.*, 2009). IL-4 è stata inizialmente riconosciuta come un fattore di sopravvivenza e differenziazione dei linfociti B (Paul *et al.*, 1987). E’ stato recentemente stabilito che la produzione di anticorpi richiede la presenza *in vivo* di cellule Tfh e non di cellule Th2 o Th17 (Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2008). Le cellule Tfh dei centri germinativi possono produrre IL-4 (Kim *et al.*, 2001; Fazilleau *et al.*, 2009a; Reinhardt *et al.*, 2009; Glatman Zaretsky *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009; Yusuf *et al.*, 2010; Cannons *et al.*, 2010) indipendentemente dalla differenziazione Th2 (Yusuf *et al.*, 2010; Cannons *et al.*, 2010). IL-4 ha un effetto anti-apoptotico sulle cellule B (Nelms *et al.*, 1999; Wurster *et al.*, 2002) e svolge un ruolo protettivo sulle cellule B tendenzialmente prone

all'apoptosi (Liu *et al.*, 1989). IL-4 induce *switch* isotipico delle IgG₁ e delle IgE nell'uomo e nel topo. La Fig. 4 illustra schematicamente gli eventi cellulari e molecolari che si verificano nei linfonodi e che portano alla differenziazione delle cellule B a plasmacellule ed alla produzione di anticorpi.

IV. CELLULE TFH-LIKE DEL SANGUE PERIFERICO UMANO

Le cellule Tfh sono state inizialmente descritte come una popolazione di cellule T CXCR5⁺ localizzate nei centri germinativi delle tonsille umane (Schaerli *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Breitfeld *et al.*, 2000). Una sostanziale popolazione di cellule T CXCR5⁺ è stata identificata anche nel compartimento dei linfociti CD4⁺ nel sangue periferico umano (Kim *et al.*, 2001; Breitfeld *et al.*, 2000). La precisa correlazione tra le cellule Tfh tonsillari e quelle periferiche è in parte sconosciuta. Le cellule T tonsillari CXCR5⁺ CD4⁺ sono considerate cellule Tfh “canoniche” (Schaerli *et al.*, 2000; Breitfeld *et al.*, 2000; Chtanova *et al.*, 2004). In effetti, CXCR5 è un marker subdolo *in vitro* in quanto le cellule Tfh umane tendono a perderne l'espressione (Schaerli *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Bossaller *et al.*, 2006).

La produzione di IL-21 da sola è insufficiente a classificare le cellule Tfh senza la caratterizzazione di BCL-6, PD-1, CXCR5, e/o markers addizionali di differenziazione. Infatti, anche le cellule Th17

(Korn *et al.*, 2009; Manel *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008) e Th1 umane possono produrre piccole quantità di IL-21 (Ma *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2009).

L'iniziale differenziazione delle cellule Tfh e la produzione di IL-21 sono determinate nell'uomo dalla iniziale produzione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche (Ma *et al.*, 2009). La completa differenziazione richiede ulteriori segnali (Liu *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2014). La comprensione dei meccanismi di differenziazione delle cellule Tfh e di quelli che regolano la differenziazione delle cellule Tfh umane può avere implicazioni nello sviluppo di vaccini e di terapie delle malattie autoimmuni. Inoltre, può anche essere d'aiuto alla comprensione dei meccanismi alla base della produzione delle IgE nel contesto delle malattie allergiche e dell'immunoterapia specifica.

La relazione tra le cellule Tfh tonsillari ed i linfociti T CD4⁺ CXCR5⁺ del sangue periferico (Tfh-like) è stata recentemente attivamente investigata. È stato suggerito che le cellule T del sangue periferico CD4⁺ CXCR5⁺ siano cellule in uno stato di quiescenza con un fenotipo di memoria (Schaerli *et al.*, 2000). Diversamente dalle cellule Tfh tonsillari, le cellule Tfh-like del sangue periferico sembrano avere una capacità limitata nel fornire "help" alle cellule B *in vitro* (Kim *et al.*, 2001) ed esprimere bassi livelli di BCL-6 (Crotty *et al.*, 2011).

Le funzioni delle cellule Tfh umane presenti nei centri germinativi sono comparabili a quelle murine. Una eccezione è

CXCL13, il ligando di CXCR5. Nel topo, CXCL13 è espresso dalle cellule stromali e non dalle cellule Tfh (Crotty *et al.*, 2011). Nell'uomo, CXCL13 è prodotto ad elevati livelli dalle cellule Tfh (Rasheed *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004) e non da altre cellule CD4⁺. CXCL13 è una chemochina che attrae i linfociti B (Kim *et al.*, 2004) e può influenzare il loro *recruitment* a livello della “*light zone*” dove risiedono la gran parte delle cellule Tfh e delle cellule dendritiche follicolari.

Di recente alcuni studi hanno caratterizzato le cellule umane periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ che condividono proprietà funzionali con le cellule Tfh “canoniche” e hanno valutato il loro ruolo nelle patologie autoimmuni. Morita e collaboratori hanno evidenziato che le cellule CXCR5⁺ rappresentano approssimativamente l'8% dei linfociti T CD4⁺ nel sangue periferico (Morita *et al.*, 2011). Come da precedenti osservazioni (Kim *et al.*, 2004; Schaerli *et al.*, 2000) le cellule periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ possono esprimere CCR7; solo una percentuale esprime molecole di attivazione quali ICOS e CD69 espresse dalle cellule Tfh “canoniche”. Per valutare la capacità “*helper*” nei confronti delle cellule B, le cellule CXCR5⁺ sono state poste in co-cultura con cellule B naive autologhe (IgD⁺ CD27⁻, CD19⁺) ed un superantigene (l'enterotossina B dello *Stafilococco aureo*). Le cellule CD4⁺ CXCR5⁺ stimolavano le cellule *naïve* B a produrre immunoglobuline (IgM, IgG e IgA). Quest'ultima osservazione suggerisce che le cellule periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ sono in grado di indurre differenziazione delle cellule B a

plasmacellule e di promuovere lo *switch* isotipico. Inoltre, è stato dimostrato che, analogamente alle cellule Tfh tonsillari (Bryant *et al.*, 2007), le cellule T periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ secernono IL-21. Inoltre, bloccando IL-21 durante le co-culture di cellule B *naïve* con cellule periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ viene inibita la produzione di anticorpi, laddove l'aggiunta di IL-21 potenzia la produzione di IgM, IgG e di IgA. Infine, bloccando l'interazione ICOS-ICOSL è inibita sia IL-21 che la produzione di immunoglobuline. Nel loro insieme, questi risultati indicano che una popolazione di cellule periferiche umane CD4⁺ CXCR5⁺ presentano alcune proprietà funzionali delle Tfh canoniche.

L'espressione di diversi recettori per chemochine è fondamentale per definire i vari subsets di cellule umane T CD4⁺. Ad esempio, CXCR3 è caratteristico di cellule del *pathway* Th1 (Bonocchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Rabin *et al.*, 2003); CCR6 è espresso dai linfociti Th17 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Annunziato *et al.*, 2007). Morita *et al.* hanno dimostrato che l'impiego dei marcatori CXCR3 e CCR6 consente di definire 3 subsets maggiori nell'ambito delle cellule T periferiche CD4⁺ CXCR5⁺. Le cellule CXCR3⁻ CCR6⁻ e CXCR3⁻ CCR6⁺ producono IL-21. Al contrario, le cellule CXCR3⁺ CCR6⁻ secernono IFN- γ , ma non citochine Th2 o Th17. Le cellule CXCR3⁻ CCR6⁻ (Th2-*like*) producono citochine Th2-*like* (IL-4, IL-5, e IL-13), oltre che IL-21; le cellule CXCR3⁻ CCR6⁺ (Th17-*like*) esprimono citochine Th17-*like* (IL-17A and IL-22) oltre che IL-21. Inoltre, le cellule CXCR3⁺ CCR6⁻

esprimono T-bet, il fattore di trascrizione delle cellule Th1; le cellule CXCR3⁻ CCR6⁻ esprimono il fattore GATA3 tipico delle cellule Th2 e le cellule CXCR3⁻ CCR6⁺ esprimono il fattore ROR γ t tipico delle cellule Th17 (Fig.5).

Le cellule periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ esprimono bassi livelli del fattore di trascrizione *BCL-6* rispetto a quelle tonsillari (Chtanova *et al.*, 2004; Rasheed *et al.*, 2006). Anche, Morita *et al.* hanno dimostrato che l'espressione di BCL-6 è espressa a livelli ridotti nei vari subsets di cellule periferiche CXCR5⁺. Sia le cellule CXCR5⁺ Th2-like che le Th17-like inducono in modo efficiente le cellule *naïve* B a proliferare e a differenziarsi in plasmablasti CD19^{lo} CD38⁺. Le cellule Th2-like inducono le cellule *naïve* B a produrre IgM, IgG, IgA ed IgE. Le cellule Th17-like stimolano le cellule B *naïve* a produrre IgM, IgG, and IgA, ma non IgE. Infine, bloccando IL-21 durante le co-culture di cellule B *naïve* con CXCR5⁺ Th2-like si riduce la produzione di IgM ed IgG, laddove bloccando l'IL-4 viene inibita la produzione di IgE (Morita *et al.*, 2011).

Come evidenziato dai risultati suddetti, le cellule periferiche CD4⁺ CXCR5⁺ sono composte da *subsets* funzionalmente distinti che condividono proprietà con cellule Th1, Th2 e Th17. Le cellule CXCR5⁺ Th2-like e le cellule CXCR5⁺ Th17-like inducono le cellule B *naïve* a produrre anticorpi in un processo mediato dall'IL-21. E' interessante sottolineare che solo una frazione di cellule Tfh presente nei centri germinativi tonsillari produce IL-4 ed IL-21 (Lane *et al.*, 2005; Ma *et al.*,

2009; Yu *et al.*, 2009). Questo subset cellulare potrebbe rappresentare un interessante target per terapie anti-allergiche e per l'immunoterapia specifica.

Bentebibel e collaboratori hanno evidenziato che una piccola popolazione di cellule ICOS⁺ CXCR3⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T compaiono transitoriamente nel sangue dopo la vaccinazione influenzale e correlano con elevati titoli di anticorpi anti-influenza (Bentebibel *et al.*, 2013). He *et al.* (2013) hanno recentemente dimostrato che cellule T *helper* circolanti CXCR5⁺ comprendono differenti subsets: CCR7^{hi} PD-1^{lo} e CCR7^{lo} PD-1^{hi}. Nel sangue periferico umano, T *helper* CCR7^{lo} PD-1^{hi} CXCR5⁺ sono aumentate in maniera transitoria dopo la vaccinazione anti-influenzale. In colture *in vitro* di T e B linfociti, le cellule CCR7^{lo} PD-1^{hi} CXCR5⁺ erano un potente stimolo per la differenziazione plasmacellulare e la produzione anticorpale. Inoltre, lo stesso gruppo ha dimostrato che pazienti con lupus eritematoso sistemico ed artrite reumatoide presentano livelli di *subsets* CCR7^{lo} PD-1^{hi} che correlavano con elevati profili anticorpali e più severa attività di malattia (He *et al.*, 2013). Sono stati chiaramente identificati due *subsets* maggiori nell'ambito delle cellule CXCR5⁺: il subset CCR7^{lo} -PD1^{hi} ha un fenotipo di cellule Tfh precursore mentre il subset CCR7^{hi} PD-1^{lo} ha un fenotipo caratteristico di cellule quiescenti. Questi risultati rappresentano un significativo avanzamento nel monitoraggio della differenziazione

delle cellule Tfh ed ampliano le nostre conoscenze sull'eterogeneità dei linfociti CD4⁺ CXCR5⁺ nel sangue periferico umano.

Locci e collaboratori hanno cercato di caratterizzare in dettaglio le cellule umane periferiche CXCR5⁺. Confrontate con le cellule Tfh dei centri germinativi, le cellule CD4⁺ CXCR5⁺ periferiche umane esprimono livelli intermedi di CXCR5 (Locci *et al.*, 2013). La maggior parte delle cellule CXCR5⁺ erano PD-1⁻, mentre una piccola proporzione di queste cellule era CXCR5⁺ ICOS⁺ e PD-1⁺. Una sostanziale popolazione (circa il 30%) di queste cellule CXCR5⁺ esprimevano PD-1 a livelli moderati e queste cellule erano ICOS⁻. E' interessante notare che l'espressione di PD-1, come anche l'espressione di CXCR5, era stabile sulla superficie cellulare. Gli autori propongono che le cellule CD4⁺PD-1⁺ CXCR5⁺ siano in uno stato quiescente con un fenotipo stabile, come le cellule della memoria. Inoltre, gli autori hanno analizzato il profilo trascrizionale di queste cellule, analizzando in particolare il profilo genico di cellule periferiche PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ che risultava essere simile a quelle delle cellule Tfh dei centri germinativi. Gli autori concludono che le cellule quiescenti CD4⁺ PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ sono una popolazione di cellule Tfh circolanti della memoria. L'attivazione di PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ e PD-1⁺ CXCR5⁺ è coinvolta nella produzione di alti livelli di IL-21 e CXCL13. Inoltre, cellule CD4⁺PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ hanno un profilo citochinico comparabile a quello delle Tfh dei centri germinativi. E' importante che in co-culture T:B, le cellule PD-1⁺

CXCR3⁻ CXCR5⁺ CD4⁺ erano di gran lunga superiori nell'induzione della differenziazione di cellule B della memoria in plasmacellule e nella produzione di IgG. Gli autori hanno concluso che linfociti PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺ sono cellule Tfh quiescenti della memoria con un profilo genico Tfh ed un'alta capacità helper verso le cellule B. Infine, hanno dimostrato che pazienti con infezione da HIV in grado di produrre anticorpi contro il virus hanno un'elevata percentuale di cellule Tfh funzionali con fenotipo T CD4⁺ PD-1⁺ CXCR3⁻ CXCR5⁺.

Nel loro insieme, i risultati descritti estendono le nostre conoscenze sui diversi subsets di cellule Tfh periferiche umane. La Fig.6 mostra che, l'integrazione di PD-1, ICOS, CXCR3 e CCR7 nell'analisi di cellule CXCR5⁺ facilita l'identificazione e le funzioni delle cellule periferiche Tfh sia nei soggetti sani che in pazienti con malattie immunologiche o nel corso della vaccinazione e nei tumori.

V. LE CELLULE T_{FH}-LIKE E LE CELLULE TREG FOLLICOLARI

Oltre alle cellule periferiche Tfh, sono stati identificati alcuni subsets non convenzionali di cellule T_{fh} e Treg follicolari (Tangye *et al.*, 2013). Cellule natural killer T (NKT) esprimono un TCR *semi-invariant* (V_α24J_α18 nell'uomo) che riconosce antigeni glicolipidici (α-galactosylceramide e simplexide) presentati da CD1d espresso sulle cellule presentanti l'antigene (APCs) e sui monociti (Jervis *et al.*, 2012;

Loffredo *et al.*, 2014). Recenti evidenze indicano che subsets murini e umani di NKT presenti nelle tonsille ed esperimenti CXCR5 sono capaci di fornire *help* alle cellule B attraverso la produzione di IL-21 (Chang *et al.*, 2012). Anche alcune cellule T $\gamma\delta$ esprimono CXCR5 e possono fornire *help* alle cellule B (Caccamo *et al.*, 2012; Vermijlen *et al.*, 2007). Queste cellule non producono IL-21 e sono dipendenti dall'IL-21 estrinseca per differenziarsi in cellule $\gamma\delta$ T_{fh}.

Le cellule Treg sono una popolazione eterogenea di cellule T con proprietà soppressive fondamentali per il mantenimento della tolleranza immunologica e la prevenzione delle risposte autoimmuni (Palomares *et al.*, 2010). Le cellule Treg possono essere classificate in due principali subsets: quelle timo-derivate CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg (nTreg) e quelle inducibili Treg (iTreg) generate in periferia (Sakaguchi *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003). Le cellule Treg modulano sia la fase di sensibilizzazione allergica che le fasi effettrici. Questi complessi effetti sono ottenuti attraverso l'inibizione della degranulazione indotta da allergene delle cellule effettrici (Kashyap *et al.*, 2008), l'inibizione di cellule Th2 (Akdis *et al.*, 2009) e l'inibizione della sintesi di IgE (Meiler *et al.*, 2008; Akdis *et al.*, 2011).

Recenti evidenze indicano che l'attività delle cellule T_{fh} può essere modulata da cellule Treg presenti nei follicoli linfatici. Queste cellule, originariamente descritte nelle tonsille (Lim *et al.*, 2004), comprendono il 10 - 15% delle cellule T nei tessuti linfoidei umani e

murini (Chung *et al.*, 2011; Wollenberg *et al.*, 2011). Esse possiedono alcune caratteristiche in comune sia con cellule Tfh che con le cellule Treg, ma non esprimono CD40L, IL-21 e IL-4 (Linterman *et al.*, 2011). Viceversa, queste cellule esprimono livelli elevati di PD-1.

Un livello aggiuntivo di complessità è fornito dagli effetti indiretti e diretti dell'IL-21 sulle cellule Treg. IL-21 sopprime in maniera diretta l'espressione di Foxp3 nelle cellule Treg murine (Nurieva *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2007). Inoltre, IL-21 inibisce la produzione di IL-2 dalle cellule T, compromettendo in questo modo l'omeostasi Treg (Attridge *et al.*, 2012). Infine, IL-21 rende le cellule T CD4⁺ resistenti alla soppressione Treg mediata attraverso l'inibizione della produzione di IL-2 da parte delle cellule CD4⁺ (Peluso *et al.*, 2007).

VI. IL-21 ED IL RECETTORE IL-21R

Il gene dell'IL-21 nell'uomo è stato mappato a livello della regione 4q26-q27 ed è solo 180 kb distante dal gene dell'IL-2 (Parrish-Novak *et al.*, 2000). La struttura degli esoni ed introni dei geni dell'IL-2 e dell'IL-21 è molto simile. La loro vicinanza e la loro somiglianza genetica suggeriscono che i due geni potrebbero nascere da una duplicazione (Parrish-Novak *et al.*, 2002).

Il recettore umano IL-21R è stato scoperto indipendentemente da due gruppi di ricercatori (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*,

2000). Esso è localizzato a livello della regione 16p11, circa 39 kb distante dal IL-4R α . Anche in questo caso potrebbe essere il risultato di una duplicazione genetica. Il recettore murino IL-21R condivide la struttura conservata ed i domini funzionali del recettore umano.

IL-21R è espresso sui linfociti B, T, NKT e sulle cellule dendritiche (DCs) (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2003a; Brandt *et al.*, 2003b). IL-21R è espresso sia sui subsets CD4⁺ che sui CD8⁺. L'ampia distribuzione cellulare dell'IL-21R indica un vasto ruolo del network IL-21/IL21R nell'immunità innata ed adattativa.

In contrasto con l'ampia espressione dell'IL-21R nei compartimenti linfoidi, IL-21 è espressa quasi esclusivamente dai linfociti T CD4⁺ attivati. Infatti, IL-21 non è rilevabile in cellule CD8⁺, CD19⁺, cellule dendritiche o monociti (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003b). Sebbene sia le cellule Th1 che le cellule Th2 possano produrre IL-21, le cellule Tfh sono la fonte maggiore di IL-21 (Chtanova *et al.*, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005a; Vinuesa *et al.*, 2005b; Rasheed *et al.*, 2006; Bryant *et al.*, 2007). Data l'ampia espressione del pattern dell'IL-21R su un ampio spettro di cellule del sistema immunitario, non sorprende che IL-21 eserciti effetti pleiotropici. Infatti, IL-21 può modulare varie funzioni delle cellule B, delle cellule dendritiche, di linfociti Th1, Th2, Th17, NK e di linfociti CD8⁺.

VII. IL-21 E LE CELLULE TFH NELLE MALATTIE ALLERGICHE

Alla luce degli effetti pleiotropici dell'IL-21 sulle funzioni di diversi componenti dell'immunità innata e adattativa, è stato agevole predire i ruoli fondamentali dell'IL-21 nelle malattie autoimmuni (Simpson *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010), nella risposta immunologica alle infezioni batteriche e virali (Cubas *et al.*, 2013; Locci *et al.*, 2013; Pallikkuth *et al.*, 2012) e nella crescita di tumori (Gu-Trantien *et al.*, 2013).

Numerose evidenze indicano che IL-21 e le cellule Tfh potrebbero svolgere un ruolo significativo nella patogenesi delle malattie allergiche. È noto che nelle malattie allergiche, l'allergene induce una risposta Th2 che porta alla maturazione di cellule B della memoria che producono anticorpi IgE antigene-specifici (Gould *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2013; Wu and Zarrin, 2014). Successive esposizioni all'allergene provocano il *cross-linking* delle IgE sui mastociti e sui basofili che determinano il rilascio di mediatori pro-infiammatori e di chemochine/citochine che sono responsabili dei sintomi allergici (Borriello *et al.*, 2014; Galli and Tsai, 2012). In questo contesto, la produzione di IgE dalle plasmacellule è fondamentale nella cascata immunopatologica dei disordini allergici. La biologia *in vivo* and *in vitro* dei linfociti B che producono anticorpi IgE (linfociti IgE⁺), inclusi i pathway(s) attraverso i quali le cellule B si differenziano dalle cellule *naïve* alle cellule B della memoria è in gran parte sconosciuta (Wu and

Zarrin,2014). La Fig. 7 illustra un modello di produzione e regolazione della produzione di IgE *in vivo*. Le IgE sono prodotte attraverso diversi *pathways* sia a livello extrafollicolare che a livello dei centri germinativi. Le risposte precoci IgE sono a bassa affinità ed originano da fonti extrafollicolari, laddove le risposte tardive IgE sono ad alta affinità e nascono nei centri germinativi. (Slavin *et al.*,1992). All'interno dei centri germinativi, le cellule T_{fh} forniscono *help* per attivare le cellule B che possono andare incontro a due differenti tipi di *switch* isotipico (*Class Switch Recombination: CSR*): un *pathway* diretto con *switching* IgM-IgE (*Direct CSR*) o uno sequenziale (*switching* IgM-IgG₁ e successivamente IgE) (Geha *et al.*, 2003). Lo *switch* sequenziale CSR genera IgE a breve emivita. Quello indiretto può anche generare plasmacellule IgE a breve emivita. Una minoranza di plasmacellule IgE a lunga emivita residenti nel midollo sostiene la produzione di IgE. Altri linfociti B IgE⁺ si differenziano in cellule B della memoria IgE⁺ (Talay *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2012; Wu, and Zarrin 2014).

E'importante notare che le cellule B che producono IgE possono andare incontro a processi di selezione clonale e maturazione dell'affinità (che determinano la produzione di IgE) nelle vie aeree, nei tessuti linfoidei associati all'intestino e nei pazienti con rinite allergica cronica (Durham *et al.*,1997; Coker *et al.*, 2003; Kleinjan *et al.*, 2000), asma (Takhar *et al.*, 2007) ed allergia alimentare (Coëffier *et al.*, 2005).

Queste osservazioni indicano che le IgE possono essere dunque prodotte localmente nelle nicchie di tessuti linfatici vicini o all'interno dei siti anatomici affetti.

Il ruolo di IL-21 e delle cellule Tfh nella regolazione della sintesi di IgE ed altri aspetti delle malattie allergiche sia nell'uomo che nel topo restano ancora enigmatici. IL-21 potrebbe avere sia effetto di controllo regolatorio positivo che negativo delle cellule B a seconda delle condizioni di stimolazione (*in vitro* vs. *in vivo*, stimoli di attivazione, presenza di altre citochine, etc.) e specie animali esaminate.

Affronteremo prima gli effetti *in vitro* di IL-21 sulle cellule B e sulla produzione di IgE. Nell'originale caratterizzazione di IL-21, Parrish-Novak *et al.* (2000) riportarono che IL-21 stimolava la proliferazione delle cellule B umane indotte da anti-CD40, laddove la citochina inibiva la proliferazione indotta da IL-4 ed anti-IgM. Ozaki e collaboratori (Ozaki *et al.*, 2002) hanno riportato che la produzione di IgE ed IgG₁ è normale in topi *IL-21R^{-/-}* dopo stimolazione con CD40 e IL-4. E' interessante segnalare che i topi *IL-21r^{-/-}* hanno un aumento delle concentrazioni sieriche di IgE ed un decremento di IgG comparate con il topo *wild type* (Kasaian *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003). Inoltre, in questi topi la produzione di IgE antigene-specifiche era elevata (Mehta *et al.*, 2003). Suto *et al.* (2002) hanno esaminato gli effetti *in vitro* ed *in vivo* di IL-21 nel topo. Questi autori hanno dimostrato che la somministrazione i.p. di IL-21 inibisce la produzione di IgE antigene-

specifica. In aggiunta, IL-21 inibisce *in vitro* la produzione di IgE indotta da IL-4, ma non la produzione di IgG₁. Inoltre, IL-21 inibisce la trascrizione IL-4-indotta della linea germinativa C ϵ nelle cellule B senza modificare la fosforilazione STAT6. Una possibile spiegazione per il ruolo di IL-21 nell'induzione delle IgG₁ e nella repressione della sintesi delle IgE è che IL-21 inibisce lo *switching* successivo delle IgG₁ alle IgE (Erazo *et al.*, 2007). Appare opportuno segnalare che questi studi condotti nell'animale da esperimento non sono estendibili alla regolazione della sintesi di IgE nell'uomo.

Gli effetti dell'IL-21 sulla sintesi di IgE nell'uomo sono stati esaminati da Wood *et al.* (2004); questi autori hanno dimostrato che IL-21 potenzia la proliferazione e la produzione dalle cellule B mediata da IL-4 e IL-13 sia delle IgE che delle IgG. Utilizzando *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), essi hanno riportato che IL-21 potenzia la produzione di IgE stimolata con anti-CD40 e IL-4 o IL-13. Infine, essi hanno riportato che IL-21 blocca la sintesi di IgE indotta da PHA e IL-4 dai PBMC presumibilmente attraverso l'induzione di IFN- γ . Ettinger *et al.*, (2005) hanno dimostrato che IL-21 induce la differenziazione delle plasmacellule dopo stimolazione con anti-CD40 ed anti-IgM dalle cellule B *naïve* del sangue del cordone ombelicale. Inoltre, IL-21 induce una robusta produzione di IgG and IgM dalle cellule B umane, laddove IL-4 inibiva la differenziazione anti-CD40 e anti-IgM indotta delle plasmacellule indotta da IL-21. Pene *et al.* hanno riportato che IL-21

potenzia la produzione di IgE sia in cellule umane *naïve* CD19⁺ CD27⁻ che cellule B CD19⁺ CD27⁺ stimulate da anti-CD40 e IL-4 (Pene *et al.*, 2006). Viceversa, IL-21 inibisce la produzione di IgE indotta da IL-4 in colture di PBMC attraverso un meccanismo IFN- γ -dipendente mediato dalle cellule T e NK. Bryant *et al.* (2007) hanno riportato che IL-21 è un potente stimolo per la produzione di IgE, IgG, e IgM dalle cellule B umane. Inoltre, hanno dimostrato che IL-4 inibisce l'effetto stimolante dell'IL-21 sulle cellule B *naïve*, ma non sulle B della memoria. È stato dimostrato in un modello murino che cellule B dei centri germinativi possono andare incontro ad uno *switch* secondario alle IgE in un processo che richiede IL-4 ed è inibito da IL-21 (Erazo *et al.*, 2007). Inoltre, IL-21 inibisce lo *switch* sequenziale CSR verso le IgE nelle cellule B stimulate con IL-4 (Kitayama *et al.*, 2008). Avery *et al.* (2008) hanno dimostrato che IL-21 stimola la produzione di IgG₁ and IgG₃ dalle cellule umane *naïve* B attivate da CD40L. IL-21 e IL-4 in maniera sinergica aumentano la produzione di IgG₁ da cellule B CD40L-stimolate, mentre IL-4 inibisce lo switch IgA. Recentemente, Kobayashi *et al.* (2009) hanno riportato che IL-21 potenzia la sintesi di IgE, di cellule B *naïve* e di cellule della memoria indotte da IL-4 ed anti-CD40.).

Nell'insieme, questi risultati evidenziano la complessa dinamica esistente tra IL-21 e IL-4 nella regolazione della produzione di IgG, IgA ed IgE. Inoltre, suggeriscono che IL-21 eserciti effetti differenti o opposti sulla sintesi di IgE a seconda delle specie animali esaminate

(topo *vs.* uomo), condizioni sperimentali (co-incubazione con IL-4), tipo di stimolo (cellule B isolate *vs.* PBMC) o cellule esaminate (linfociti B *naïve vs. memory*).

Gli studi che hanno esaminato gli effetti *in vivo* di IL-21 hanno evidenziato risultati talora contrastanti. Usando un modello murino di rinite allergica indotto dalla ripetuta sensibilizzazione e stimolazione nasale con ovalbumina (OVA), Mazda *et al.* hanno dimostrato che la somministrazione intranasale di IL-21 riduce le concentrazioni sieriche di IgE OVA-specifiche, l'infiltrazione eosinofila ed il numero di starnuti (Hiromura *et al.*, 2007). In un altro modello murino di anafilassi lo stesso gruppo ha riportato che la somministrazione di IL-21 inibisce le reazioni anafilattiche (Kishida *et al.*, 2007). In un modello murino di reazioni da ipersensibilità cutanea IgE-mediata, la somministrazione i.p. di IL-21 durante o dopo la procedura di sensibilizzazione riduce le reazioni cutanee e le concentrazioni sieriche di IgE totali e OVA-specifiche (Tamagawa-Mineoka *et al.*, 2011). Sia l'espressione proteica di IL-21 che di IL-21R è stata trovata upregolata nelle lesioni cutanee di pazienti con dermatite atopica (Jin *et al.*, 2009). Inoltre, topi *Il-21r^{-/-}* non evidenziano una flogosi cutanea dopo sensibilizzazione epicutanea (e.c.). Inoltre, la somministrazione epicutanea di un recettore solubile IL-21R-IgG₂aFc inibisce la risposta cutanea e sistemica alla sensibilizzazione epicutanea. Collettivamente, queste ultime osservazioni suggeriscono un ruolo importante di IL-21 e del suo recettore nella risposta allergica.

E'interessante segnalare che bambini affetti da forme severe di dermatite atopica hanno ridotti livelli sierici di IL-21 se confrontati con soggetti normali (Lin *et al.*, 2011).

Di recente, Kita *et al* (2014) hanno riportato in un modello murino di flogosi polmonare indotta da allergene che la somministrazione di IL-33 induce cellule Th2 e Tfh antigene specifiche; viceversa, la IL-1beta induce prevalentemente cellule Tfh. Inoltre, topi deficienti in ICOS sviluppano cellule Th2 ed anticorpi IgE/IgG1 quando esposti ad antigene ed IL-33. Viceversa, quando esposti ad OVA ed IL-1 β , topi ICOS-deficienti mostrano una riduzione delle cellule Tfh e ridotti livelli di anticorpi IgE/IgG1. Nell'insieme questi risultati, enfatizzano la rilevanza delle citochine della famiglia IL-1 nello sviluppo sia di cellule Th2 sia di cellule Tfh in un modello murino di disordine allergico (Kobayashi *et al.* 2014).

Lo scopo di questa tesi sperimentale è stato quello di valutare comparativamente in un gruppo di pazienti con rinite allergica stagionale ed in un gruppo di donatori non atopici l'effetto della IL-21 sulla sintesi *in vitro* di IgE e la percentuale di cellule Tfh nel sangue periferico dei due gruppi esaminati.

VIII. MATERIALI E METODI

1) SKIN PRICK TESTS E IMMUNOCAP®

Prima di effettuare ogni esperimento, abbiamo studiato l'assetto allergologico di ciascun paziente attraverso una valutazione clinica e l'esecuzione di skin prick tests per i comuni aeroallergeni. La valutazione è stata effettuata presso il Royal Brompton Hospital-National Heart and Lung Institute of London. La sensibilizzazione allergica dei pazienti è stata valutata in vitro attraverso metodica ImmunoCap® (Phadia).

2) ISOLAMENTO DELLE PBMCs (*PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS*) DAL SANGUE PERIFERICO

Il sangue venoso periferico (circa 200 ml per ogni donatore) di 12 volontari sani e 12 pazienti affetti da rinite allergica stagionale persistente con positività al polline di Graminacee, è stato raccolto in provette eparinate sterili. Successivamente è stato, centrifugato (1500 rpm per 10 minuti a 20°C.). Il plasma è stato rimosso e conservato a -20°C per possibili studi futuri. Il plasma residuo è stato diluito con RPMI-1640 senza L-glutamina (Gibco, Invitrogen, UK) aggiunto in egual volume rispetto al plasma rimosso. 35 ml di ogni campione diluito è stato con stratificato cautela su 15 ml di Ficoll (VWR International

Ltd., UK) in provette da 50 ml. Dopo la centrifugazione (2200 rpm, per 25 minuti, a 20°C,) i PBMCs venivano isolati e posti in mezzo di cultura. I PBMCs venivano piastrati alla concentrazione di 2×10^6 cellule/ml in piastre di coltura RPMI contenete il 10% di *fetal calf serum* (FCS), 50 U/ml di penicillina, 50 mg/ml di streptomicina e 2 mM di L-glutamina. Ai fini dell'attivazione le cellule venivano incubate con CD40L (100 ng/ml) e IL-4 (100 ng/ml). Al termine delle colture (10-14 giorni) il surnatante veniva raccolto e le concentrazioni di IgE totali venivano determinate con la metodica ImmunoCAP[®]

3) ISOLAMENTO DEI B LINFOCITI

Due terzi dei PBMCs venivano utilizzati per l'isolamento delle cellule CD19⁺ corrispondenti ai B linfociti. I PBMCs venivano risospesi in *Stem Cell Buffer* alla concentrazione di 50×10^6 /ml. A questa sospensione cellulare venivano aggiunti 50 µl/ml di *Easy Sep[®] human B cell enrichment*. La sospensione veniva vortexata ed incubata per 10 min a 22°C. Al termine della incubazione si aggiungevano le nanoparticelle magnetiche *Easy Sep* per 30 secondi. Quindi si aggiungevano 75 µl/ml di particelle magnetiche *Easy Sep D*. Si vortexavano ed incubavano per 5 min a 22° C. Si invertivano il magnete e si versava il contenuto delle provette in provette di polistirene da 5 ml. Le cellule venivano centrifugate per 10 min a 200 g a 22° C. Le cellule ottenute venivano

risospese in 250 μ l di *Stem Cell Buffer*. Le cellule rappresentavano B linfociti CD19⁺.

I B linfociti venivano successivamente separati in B linfociti della memoria (CD27⁺) e B linfociti *naive* (CD27⁻). Per l'isolamento delle cellule CD27 si aggiungevano 20 μ l di *Easy Sep human CD27⁺ selection cocktail*. Le cellule venivano vortexate ed incubate a 22° C per 15 min; si miscelavano le nanoparticelle magnetiche *Mix Easy Sep®* pipettando più volte; si aggiungevano lo *Stem Cell Buffer* fino a raggiungere un volume totale di 2,5 ml pipettando 2-3 volte e ponendo la sospensione cellulare a 22°C per 5 min; si invertiva il magnete e si versava il sopranatante in provette di polisterene da 5 ml. Il sopranatante conteneva le cellule B linfociti naive CD27⁻.

Per isolare i B linfociti della memoria CD27⁺ si rimuoveva la provetta dal magnete, si aggiungevano 2,5 ml di *Stem Cell Buffer*, si miscelava gentilmente pipettando 2-3 volte, si rimetteva la provetta nel magnete e si deponeva per 5 min a 22°C; si rimuoveva il sopranatante e si ripeteva la procedura 3 volte. Al termine della procedura rimanevano aderenti alle particelle magnetiche nel magnete una popolazione di B linfociti della memoria CD27⁺.

4) ISOLAMENTO DELLE PLASMACELLULE

Un terzo dei PBMCs veniva utilizzato per l'isolamento delle plasmacellule CD138⁺. A tal proposito, si sospendevano 100x10⁶ cellule/ml in *Stem Cell Buffer*. Si aggiungevano 100 µl/ml di Easy Sep® nanoparticelle magnetiche senza vortexare; si portava al volume di 2,5 ml con *Stem Cell Buffer*; si incubavano per 5 min a 22° C nel magnete ed al termine della incubazione le cellule CD138⁺ corrispondenti alla plasmacellule risultavano aderenti alle particelle magnetiche del magnete. Si rimuoveva la provetta dal magnete, si aggiungevano 2,5 µl di *Stem Cell Buffer* e si pipettava gentilmente; si riposizionava la provetta nel magnete per 5 min; al termine dell'incubazione si eliminava il sopranatante ripetendo la procedura 3 volte. Le cellule ottenute venivano risospese alla concentrazione 50x10⁶/ml.

5) STIMOLAZIONE DELLA PRODUZIONE DI IGE

Per valutare l'effetto di IL-21 e del CD40L e di IL-4 sulla sintesi di IgE si sospendevano le cellule alla concentrazione di 50 x 10⁶/ml; si risospendevano 500.000 cellule per pozzetto e si aggiungevano 100 µl di cellule + 100 µl di IL-21 + CD40L e IL-4. Dopo 6 giorni di stimolazione, si prelevava il sopranatante e si misuravano le concentrazioni totali di IgE con la tecnica ImmunoCAP®.

6) VALUTAZIONE DEI LINFOCITI T CD4⁺, CXCR5⁺, IL-21⁺, PD1⁺ DEL SANGUE PERIFERICO ATTRAVERSO CITOFUORIMETRIA

Le cellule del sangue periferico T CD4⁺, CXCR5⁺, IL-21⁺, PD1⁺, (*Tfh-like cells*) sono state quantificate attraverso analisi citofluorimetrica. I PBMCs ottenuti dai donatori allergici e dai donatori sani sono stati venivano valutati con un citofluorimetro FACSCanto II.

7) VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI CELLULE ESPRIMENTI MRNA PER LA IL-21

Dai PBMCs isolati da 6 pazienti allergici e 6 pazienti non allergici abbiamo estratto l'mRNA utilizzando la tecnologia QiaCube (Qiagen). Successivamente, abbiamo utilizzato specifici primers per la IL-21 per rilevare le cellule esprimenti mRNA per IL-21 attraverso RT-PCR.

8) ANALISI STATISTICA

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti in almeno 6 esperimenti separati da diversi donatori. I risultati sono presentati con media \pm SEM. I risultati del trattamento dei diversi gruppi veniva analizzato con il test di Student. Le correlazioni lineari venivano analizzate con il test di Spearman.

IX. RISULTATI

Nel primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di IL-21 (100 ng/ml) sulla produzione di IgE totali da PBMCs isolati da 12 pazienti allergici e 12 non allergici stimolati con CD40L (100 ng/ml) e rIL-4 (100 ng/ml). I sopranatanti sono stati raccolti dopo 10-14 giorni di cultura ed analizzati con metodica ImmunoCAP[®]. I dati rappresentano la media \pm SD di 12 indipendenti esperimenti. Come si evince dalla Fig.8 pannello A, IL-21 induce la produzione di IgE totali da PBMCs attivati da CD40L ed IL-4. Inoltre, la IL-21 potenzia sinergicamente la produzione di IgE totali da PBMCs attivati da CD40L e IL-4 (pannello B).

Nel secondo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di concentrazioni crescenti di IL-21 (da 1 a 100 ng/ml) sulla sintesi di IgE da cellule B *naïve* (CD19⁺ CD27⁻), cellule B della memoria (CD19⁺ CD27⁺) e plasmacellule (CD138⁺). I PBMCs sono stati purificati da 6 differenti donatori allergici. I dati rappresentano la media \pm SD di 6 esperimenti indipendenti. La figura 9 mostra che in pazienti con rinite allergica stagionale concentrazioni crescenti di IL-21 (da 1 a 10 ng/ml) inducono la produzione di IgE dai linfociti B *naïve*, dai linfociti B della memoria e dalle plasmacellule in maniera concentrazione-dipendente.

Inoltre, abbiamo valutato la sintomatologia dei pazienti attraverso il *Rhinitis Total Nasal Symptom Scores* (RTNS) nei pazienti

allergici e nei pazienti non allergici. Come era atteso, e' possibile osservare che lo score sintomatologico dei pazienti con rinite allergica stagionale è di gran lunga superiore a quella dei soggetti di controllo non allergici (Fig.10).

In un successivo gruppo di esperimenti abbiamo analizzato tramite citofluorimetria la percentuale di cellule *Tfh-like* nel sangue periferico di soggetti allergici e di soggetti non atopici. I risultati presentati in Fig 11 evidenziano che la percentuale di cellule *Tfh-like* è significativamente aumentata in pazienti con rinite allergica stagionale rispetto ai controlli non atopici (Fig. 11). Quest'ultima osservazione è stata estesa attraverso la valutazione tramite *RT-PCR* delle cellule esprimenti mRNA per IL-21. La Fig. 12 mostra che la percentuale di cellule esprimenti *mRNA* per IL-21 è significativamente maggiore nei pazienti con rinite allergica stagionale rispetto al gruppo di controllo.

In un ultimo gruppo di esperimenti abbiamo correlato la produzione *in vitro* di IgE totali e la percentuale di cellule *Tfh-like* nel sangue periferico di pazienti con rinite allergica stagionale. La Fig. 13 mostra l'esistenza di una correlazione ($r= 0.59$; $p<0.05$) lineare tra la produzione di IgE totali nei sopranatanti di B linfociti attivati da IL-21 e le cellule *Tfh-like* nel sangue periferico di pazienti con rinite allergica stagionale.

X. CONCLUSIONI

I risultati dei nostri esperimenti hanno evidenziato che IL-21 potenzia la produzione di IgE dai *PBMCs* del sangue periferico umano. Inoltre, IL-21 induce la produzione di IgE dalle cellule B e dalle plasmacellule del sangue periferico umano.

La percentuale di linfociti *Tfh-like* ($CD4^+$, $CXCR5^+$, $IL21^+$, $PD1^+$) del sangue periferico umano è aumentata in maniera significativa in pazienti con rinite allergica stagionale rispetto a controlli non atopici. Inoltre, la percentuale di cellule che esprimono mRNA per IL-21, valutata tramite RT-PCR, è significativamente aumentata in pazienti allergici rispetto ai controlli. Infine, la percentuale di cellule *Tfh-like* presenti nel sangue di pazienti con rinite allergica stagionale correla in maniera lineare con la produzione *in vitro* di IgE totali.

Questi dati mostrano per la prima volta che IL-21 svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della produzione di IgE e che le cellule *Tfh-like* del sangue periferico sono significativamente aumentate in pazienti con rinite allergica stagionale rispetto a controlli non atopici.

Sebbene, i linfociti *Tfh* ed alcuni *subsets* di cellule *Tfh-like* periferici sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella maturazione dei linfociti B e nella loro differenziazione in plasmacellule, il ruolo di IL-21 e dei vari *subsets* periferici di linfociti *Tfh-like* nelle malattie allergiche deve essere ulteriormente approfondito.

XI. OPEN QUESTIONS

Gli studi finora effettuati sul possibile ruolo delle cellule Tfh nelle malattie allergiche sono concentrati indirettamente sul ruolo di IL-21 e sulla produzione di anticorpi IgE. Appare ormai evidente che le cellule Tfh “canoniche” (Lane *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009) ed alcuni *subsets* di cellule del sangue periferico Tfh-like ($CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^- CCR6^-$) possono produrre IL-4 ed esprimere CD40L (Morita *et al.*, 2011). Gli studi condotti *in vitro* ed *in vivo* nell'uomo e nel topo mostrano differenti, talora contrastanti, risultati sugli effetti di IL-21 sulla produzione di IgE. Inoltre, sebbene sia stato dimostrato che IL-21 inibisca lo *switching* sequenziale delle IgG₁ verso le IgE (Erazo *et al.*, 2007), non è stato ancora precisato se IL-21 abbia un effetto simile sullo *switching* diretto verso le IgE.

Appare ormai evidente che i linfociti $CD4^+ CXCR5^+$ presenti nel sangue periferico umano comprendono differenti *subsets* di cellule Tfh-like (Morita *et al.* 2011; He *et al.*, 2013; Locci *et al.*, 2013). Ulteriori studi dovrebbero valutare quali *subset(s)* di cellule periferiche umane e/o dei centri germinativi svolgono un ruolo significativo nella patogenesi delle malattie allergiche. Inoltre, sarebbe interessante valutare in future esperienze se queste stesse cellule o altri *subsets* possano modulare la produzione di anticorpi protettivi IgG₄ e le risposte IgE nel corso di immunoterapia specifica.

Gran parte degli studi sulle cellule Tfh sono stati effettuati in modelli animali. Numerosi studi hanno evidenziato possibili alterazioni delle cellule Tfh del sangue periferico nelle malattie autoimmuni (Morita *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 2010) e durante infezioni virali e batteriche (Locci *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Bentebibel *et al.*, 2013). Tuttavia, sinora non sono stati effettuati studi sulle diverse popolazioni di cellule Tfh-like presenti nel sangue periferico in pazienti affetti dalle malattie allergiche.

Ulteriori studi appaiono indispensabili al fine di elucidare le differenze funzionali tra i diversi *subsets* di cellule Tfh-like periferiche nelle malattie allergiche. Molteplici studi hanno fornito solide evidenze sperimentali sul ruolo fondamentale di tali cellule nelle malattie autoimmuni, alcune immunodeficienze e nei tumori. Appare evidente che ulteriori indagini sono indispensabili per comprendere i meccanismi che regolano la funzione delle cellule Tfh-like nella omeostasi immunitaria al fine di modulare l'evoluzione di patologie autoimmuni, allergiche e neoplastiche. E'ormai evidente che vi sono differenze tra gli studi effettuati sul ruolo di IL-21 *in vitro* ed *in vivo*. Infine, gli studi condotti in modelli murini non riflettono gli equivalenti processi nell'uomo.

In conclusione, i linfociti Tfh sono essenziali nella differenziazione dei linfociti B in plasmacellule. I risultati emersi dagli esperimenti condotti in questa tesi indicano che tali cellule potrebbero avere un ruolo rilevante nella produzione di IgE e quindi nelle malattie

allergiche. Sinora, l'evidenza di un ruolo pro- o anti-allergico di diversi *subsets* di cellule Tfh è inconclusiva ed è prevalentemente focalizzata sugli effetti di IL-21. Ulteriori studi volti a precisare gli effetti funzionali dei diversi *subsets* di Tfh e di IL-21 nel contesto di malattie allergiche appaiono necessari e fondamentali per comprendere se l'inibizione o la stimolazione di queste cellule o del network IL-21/IL21R possano rappresentare un possibile target terapeutico.

XII. BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8: 639-646, 2007
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123: 735-746, 2009
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 18-27, 2011
- Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27:190-202, 2007
- 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.* 204: 1849-1861, 2007
- Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J. Exp. Med.* 190: 1123-1134, 1999

- Attridge K, Wang CJ, Wardzinski L, Kenefeck R, Chamberlain JL, Manzotti C, Kopf M, Walker LS. IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* 119: 4656-4664, 2012
- Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, Chan TD, Palendira U, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Choo S, Bleasel KE, Peake J, King C, French MA, Engelhard D, Al-Hajjar S, Al-Muhsen S, Magdorf K, Roesler J, Arkwright PD, Hissaria P, Riminton DS, Wong M, Brink R, Fulcher DA, Casanova JL, Cook MC, Tangye SG. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* 207: 155-171, 2010
- Baumjohann D, Kageyama R, Clingan JM, Morar MM, Patel S, de Kouchkovsky D, Bannard O, Bluestone JA, Matloubian M, Ansel KM, Jeker LT. The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nat. Immunol.* 14: 840-848, 2013
- Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mejias A, Albrecht RA, Blankenship D, Xu H, Pascual V, Banchereau J, Garcia-Sastre A, Palucka AK, Ramilo O, Ueno H. Induction of ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* 5: 176ra132, 2013

- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187: 129-134, 1998
- Borriello F., Granata F., Marone G. Basophils and skin disorders. *J. Invest. Dermatol.* 134: 1202-1210, 2014
- Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, Durandy A, Baumann U, Schlesier M, Welcher AA, Peter HH, Warnatz K. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J. Immunol.* 177:4927-4932, 2006
- Brandt K, Bulfone-Paus S, Jenckel A, Foster DC, Paus R, Ruckert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1379 - 1382, 2003a
- Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Ruckert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102: 4090 - 4098, 2003b
- Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192: 1545-1552, 2000

- Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, de Waal Malefyt R, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. *J. Immunol.* 179: 8180-8190, 2007
- Caccamo N, Todaro M, La Manna MP, Sireci G, Stassi G, Dieli F. IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity. *Plos One* 7:e41940, 2012
- Cannons JL, Wu JZ, Gomez-Rodriguez J, Zhang J, Dong B, Liu Y, Shaw S, Siminovitch KA, Schwartzberg PL. Biochemical and genetic evidence for a SAP-PKC-theta interaction contributing to IL-4 regulation. *J. Immunol.* 185:2819-2827, 2010
- Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, Kaverina N, Utset TO, Meehan SM, Quigg RJ, Meffre E, Clark MR. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J. Immunol.* 186: 1849-1860, 2011
- Chang PP, Barral P, Fitch J, Pratama A, Ma CS, Kallies A, Hogan JJ, Cerundolo V, Tangye SG, Bittman R, Nutt SL, Brink R, Godfrey DI, Batista FD, Vinuesa CG. Identification of BCL-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat. Immunol.* 13: 35-43, 2012

- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198: 1875-1886, 2003
- Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J. Immunol.* 173: 68-78, 2004
- Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, Fan HM, Liu ZM, Neelapu SS, Dong C. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and BCL-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17: 983-988, 2011
- Coeffier M, Lorentz A, Manns MP, Bischoff SC. Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy. *Allergy* 60: 822-827, 2005
- Coker HA, Durham SR, Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J. Immunol.* 171: 5602-5610, 2003
- Collins M, Whitters MJ, Young DA. IL-21 and IL-21 receptor: a new cytokine pathway modulates innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.* 28: 131 - 140, 2003

- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29: 621-663, 2011
- Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G Jr, Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM, Haddad EK. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* 19: 494-499, 2013
- Durham SR, Gould HJ, Thienes CP, Jacobson MR, Masuyama K, Rak S, Lowhagen O, Schotman E, Cameron L, Hamid QA. Expression of epsilon germ-line gene transcripts and mRNA for the epsilon heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid. *Eur. J. Immunol.* 27: 2899-2906, 1997
- Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ AP, Urban JF Jr., Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 26: 191-203, 2007
- Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, Lipsky PE. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 175: 7867 - 7879, 2005
- Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated

by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10:375-384, 2009a

- Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87: 1037-1047, 1996
- Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 180:157-163, 1994
- Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* 18: 693-704, 2012
- Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 721-732, 2003
- Glatman Zaretsky A, Taylor JJ, King IL, Marshall FA, Mohrs M, Pearce EJ. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J. Exp. Med.* 206:991-999, 2009
- Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J. Immunol.* 177:5236-5247, 2006
- Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 205-217, 2008

- Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothe F, Salgado R, Duvillier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123: 2873-2892, 2013
- Harker JA, Dolgoter A, Zuniga EI. Cell-intrinsic IL-27 and gp130 cytokine receptor signaling regulates virus-specific CD4(+) T cell responses and viral control during chronic infection. *Immunity* 39: 548-559, 2013
- Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol.* 179: 5099-5108, 2007
- He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, Sun X, Vandenberg K, Rockman S, Ding Y, Zhu L, Wei W, Wang C, Karnowski A, Belz GT, Ghali JR, Cook MC, Riminton DS, Veillette A, Schwartzberg PL, Mackay F, Brink R, Tangye SG, Vinuesa CG, Mackay CR, Li Z, Yu D. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* 39: 770-781, 2013

- Hiromura Y, Kishida T, Nakano H, Hama T, Imanishi J, Hisa Y, Mazda O. L-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis. *J. Immunol.* 179: 7157-7165, 2007
- Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, Pitzalis C. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* 6: e1, 2009
- Jervis PJ, Moulis M, Jukes JP, Ghadbane H, Cox LR, Cerundolo V, Besra GS. Towards multivalent CD1d ligands: synthesis and biological activity of homodimeric alpha-galactosyl ceramide analogues. *Carbohydr. Res.* 356: 152-162, 2012
- Jin H, Oyoshi MK, Le Y, Bianchi T, Koduru S, Mathias CB, Kumar L, Le Bras S, Young D, Collins M, Grusby MJ, Wenzel J, Bieber T, Boes M, Silberstein LE, Oettgen HC, Geha RS. IL-21R is essential for epicutaneous sensitization and allergic skin inflammation in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 119: 47-60, 2009
- Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S. BCL-6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325: 1006-1010, 2009
- Kang SG, Liu WH, Lu P, Jin HY, Lim HW, Shepherd J, Fremgen D, Verdin E, Oldstone MB, Qi H, Teijaro JR, Xiao C. MicroRNAs

of the miR-17 approximately 92 family are critical regulators of T(FH) differentiation. *Nat. Immunol.* 14: 849-857, 2013

- Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA, Grusby MJ. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16: 559 - 569, 2002
- Kashyap M, Thornton AM, Norton SK, Barnstein B, Macey M, Brenzovich J, Shevach E, Leonard WJ, Ryan JJ. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 180: 2039-2043, 2008
- Kim CH, Lim HW, Kim JR, Rott L, Hillsamer P, Butcher EC. Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* 104: 1952-1960, 2004
- Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.* 193: 1373-1381, 2001
- King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 741-766, 2008

- King IL, Mohrs M. IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 206: 1001-1007, 2009
- Kishida T, Hiromura Y, Shin-Ya M, Asada H, Kuriyama H, Sugai M, Shimizu A, Yokota Y, Hama T, Imanishi J, Hisa Y, Mazda O. IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice. *J. Immunol.* 179: 8554-8561, 2007
- Kitayama D, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Miyazaki M, Tokuhisa T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated with IL-4 and IL-21. *Mol. Immunol.* 45: 1337-1345, 2008
- KleinJan A, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur. Respir. J.* 15: 491-497, 2000
- Kobayashi S, Haruo N, Sugane K, Ochs HD, Agematsu K. Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells. *Hum. Immunol.* 70: 35-40, 2009
- Kobayashi T, Iijima K, Kita H. Follicular helper T cells mediate IgE antibody production in response to airborne allergens in mice.

Abstract, 30th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 13-18 September 2014.

- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485-517, 2009
- Lane PJ, Gaspal FM, Kim MY. Two sides of a cellular coin: CD4(+)CD3- cells regulate memory responses and lymph-node organization. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 655-660, 2005
- Lin SC, Chuang YH, Yang YH, Chiang BL. Decrease in interleukin-21 in children suffering with severe atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22: 869-875, 2011
- Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, Vinuesa CG. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17: 975-982, 2011
- Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG. IL-21 acts directly on B cells to regulate BCL-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207:353-363, 2010
- Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929-931, 1989

- Liu X, Chen X, Zhong B, Wang A, Wang X, Chu F, Nurieva RI, Yan X, Chen P, van der Flier LG, Nakatsukasa H, Neelapu SS, Chen W, Clevers H, Tian Q, Qi H, Wei L, Dong C. Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* 507: 513518, 2014
- Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, Haddad EK, Poignard P, Crotty S. Human circulating PD-(+)1CXCR3(-)CXCR5(+) memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39: 758-769, 2013
- Loffredo S., Staiano RI, Granata F, Costantino V, Borriello F, Frattini A, Mangoni A, Marone G, Triggiani M. Simplexide induces CD1d-dependent cytokine and chemokine production from human monocytes. *PlosOne* 9:e111326, 2014
- Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, Deenick EK, Tangye SG. Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell. Biol.* 87: 590-600, 2009
- Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 209: 1241-1253, 2012

- Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130: 1089-1104, 2007
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* 9: 641-649, 2008
- Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet* 382: 1360-1372, 2013
- Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J. Immunol.* 170: 4111 - 4118, 2003
- Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 63: 1455-1463, 2008
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34: 108-121, 2011

- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17:701-738, 1999
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448: 480-483, 2007
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138-149, 2008
- Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C. BCL-6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001-1005, 2009
- Nurieva RI, Podd A, Chen Y, Alekseev AM, Yu M, Qi X, Huang H, Wen R, Wang J, Li HS, Watowich SS, Qi H, Dong C, Wang D. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J. Biol. Chem.* 287: 11234, 2012
- Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell

generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and BCL-6. *J. Immunol.* 173:5361-5371, 2004

- Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC, 3rd, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ: A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298: 1630-1634, 2002
- Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 11439 - 11444, 2000
- Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120: 985-993, 2012
- Parekh S, Prive G, Melnick A. Therapeutic targeting of the BCL-6 oncogene for diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 49:874-882, 2008
- Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J. Leuko. Biol.* 72: 856 - 863, 2002
- Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D,

Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57 - 63, 2000

- Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Annu. Rev. Immunol.* 5:429-459, 1987
- Peluso I, Fantini MC, Fina D, Caruso R, Boirivant M, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 178: 732-739, 2007
- Pene J, Guglielmi L, Gauchat JF, Harrer N, Woisetschlager M, Boulay V, Fabre JM, Demoly P, Yssel H. IFN-gamma-mediated inhibition of human IgE synthesis by IL-21 is associated with a polymorphism in the IL-21R gene. *J. Immunol.* 177: 5006-5013, 2006
- Pratama A, Ramiscal RR, Silva DG, Das SK, Athanasopoulos V, Fitch J, Botelho NK, Chang PP, Hu X, Hogan JJ, Mana P, Bernal D, Korner H, Yu D, Goodnow CC, Cook MC, Vinuesa CG. Roquin-2 shares functions with its paralog Roquin-1 in the repression of mRNAs controlling T follicular helper cells and systemic inflammation. *Immunity* 38: 669-680, 2013

- Rabin RL, Alston MA, Sircus JC, Knollmann-Ritschel B, Moratz C, Ngo D, Farber JM. CXCR3 is induced early on the pathway of CD4⁺ T cell differentiation and bridges central and peripheral functions. *J. Immunol.* 171: 2812-2824, 2003
- Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Muller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur. J. Immunol.* 36:1892-1903, 2006
- Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* 10:385-393, 2009
- Renshaw BR, Fanslow WC, 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davison BL, Maliszewski CR. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:1889-1900, 1994
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164, 1995
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 875-883, 1998

- Salzer E, Kansu A, Sic H, Majek P, Ikinciogullari A, Dogu FE, Prengemann NK, Santos-Valente E, Pickl WF, Bilic I, Ban SA, Kuloglu Z, Demir AM, Ensari A, Colinge J, Rizzi M, Eibel H, Boztug K. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133: 1651-1659, 2014
- Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 192:1553-1562, 2000
- Schmitt N, Bustamante J, Bourdery L, Bentebibel SE, Boisson-Dupuis S, Hamlin F, Tran MV, Blankenship D, Pascual V, Savino DA, Banchereau J, Casanova JL, Ueno H. IL-12 receptor beta1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood* 121: 3375-3385, 2013
- Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, Ueno H. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* 31:158-169, 2009
- Shulman Z, Gitlin AD, Targ S, Jankovic M, Pasqual G, Nussenzweig MC, Victora GD. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 341: 673-677, 2013
- Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC,

Vinuesa CG, Cook MC. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62: 234, 2010

- Slavin RG, Gleich GJ, Hutcheson PS, Kephart GM, Knutsen AP, Tsai CC. Localization of IgE to lung germinal lymphoid follicles in a patient with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 1006-1008, 1992
- Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 57-59, 2008
- Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, Hoshimoto A, Saito Y, Foster DC, Iwamoto I. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 100: 4565 - 4573, 2002
- Sweet RA, Lee SK, Vinuesa CG. Developing connections amongst key cytokines and dysregulated germinal centers in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 658-664, 2012
- Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EE, Zhou M, Ladi E, Lee WP, Egen JG, Austin CD, Xu M, Wu LC. IgE(+) memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.* 13: 396-404, 2012

- Tamagawa-Mineoka R, Kishida T, Mazda O, Katoh N. IL-21 reduces immediate hypersensitivity reactions in mouse skin by suppressing mast cell activation or IgE production. *J. Invest. Dermatol.* 131: 1513-1520, 2011
- Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J. Exp. Med.* 187:885-895, 1998
- Takhar P, Corrigan CJ, Smurthwaite L, O'Connor BJ, Durham SR, Lee TH, Gould HJ. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 213-218, 2007
- Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 412-426, 2013
- Vermijlen D, Ellis P, Langford C, Klein A, Engel R, Willmann K, Jomaa H, Hayday AC, Eberl M. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J. Immunol.* 178: 4304-4314, 2007
- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschek H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ, Goodnow CC. A RING-type

ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435: 452 - 458, 2005a

- Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 853 - 865, 2005b
- Vinuesa CG, Cyster JG. How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* 35: 671-680, 2011
- Vogel KU, Edelmann SL, Jeltsch KM, Bertossi A, Heger K, Heinz GA, Zoller J, Warth SC, Hoefig KP, Lohs C, Neff F, Kremmer E, Schick J, Repsilber D, Geerlof A, Blum H, Wurst W, Heikenwalder M, Schmidt-Supprian M, Heissmeyer V. Roquin paralogs 1 and 2 redundantly repress the Icos and Ox40 costimulator mRNAs and control follicular helper T cell differentiation. *Immunity* 38: 655-668, 2013
- Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, Graca L. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.* 187: 4553-4560, 2011
- Wood N, Bourque K, Donaldson DD, Collins M, Vercelli D, Goldman SJ, Kasaian MT. L-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13. *Cell. Immunol.* 231: 133-145, 2004
- Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 247-259, 2014

- Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 277:27169-27175, 2002
- Xiao N, Eto D, Elly C, Peng G, Crotty S, Liu YC. The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells. *Nat. Immunol.* ;15:657-66, 2014
- Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* 209: 353-364, 2012
- 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* 454:350-352, 2008
- Yu D, Vinuesa CG. Multiple checkpoints keep follicular helper T cells under control to prevent autoimmunity. *Cell Mol. Immunol.* 7: 198-203, 2010a
- Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol.* 31: 377-383, 2010b
- Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, Ellyard JI, Parish IA, Ma CS, Li QJ, Parish CR, Mackay CR, Vinuesa CG. The transcriptional

repressor BCL-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31:457-468, 2009

- Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, Barnett B, Crotty S. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J. Immunol.* 185:190-202, 2010
- Zhu C, Ma J, Liu Y, Tong J, Tian J, Chen J, Tang X, Xu H, Lu L, Wang S. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 943-950, 2012
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 445-489, 2010
- Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ, Nutt SL, Tarlinton DM. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207:365-378, 2010

XIII. LEGENDA DELLE FIGURE

Figura 1 Rappresentazione schematica della differenziazione di diversi subsets di linfociti umani CD4⁺. L'interazione tra linfociti T CD4⁺ *naive* con le cellule dendritiche attiva i linfociti CD4⁺. In presenza di IL-12/IFN- γ i linfociti CD4⁺ esprimono i fattori di trascrizione STAT4/t-bet assumendo caratteristiche di cellule Th1. Queste cellule producono prevalentemente IFN- γ e TNF- α e svolgono un ruolo importante nella immunità antibatterica e virale ed in alcuni aspetti dell'inflammatione. In presenza di IL-4, i linfociti CD4⁺ esprimono STAT6 e GATA3 assumendo caratteristiche di cellule Th2. Questo subset cellulare produce citochine Th2-like (IL-5, IL-4 ed IL-13). Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nei confronti dei parassiti extracellulari e nelle malattie allergiche. In presenza di TGF- β /IL-4 le cellule CD4⁺ assumono caratteristiche di cellule Th9 esprimenti PD-1 e IRF-4. Queste cellule producono prevalentemente IL-9 e svolgono un ruolo importante nella immunità nei confronti degli elminti e nella flogosi dei tumori. Le principali citochine responsabili della polarizzazione Th-17 nell'uomo sono la IL-1 β , la IL-6 e la IL-23. Viceversa, nel topo le principali

citochine polarizzanti sono il TGF- β e la IL-6. Le cellule Th17 esprimono i fattori di trascrizione ROR γ t e IRF-4 e producono prevalentemente IL-17A, IL-17F, IL-21 ed IL-22. Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nella difesa da infezioni a livello cutaneo e mucosale e nelle malattie autoimmunitarie. Le cellule Th22 sono indotte da IL-6 e TNF- α ed esprimono AHR e ROR γ t. Queste cellule producono IL-22 e TNF- α e svolgono un ruolo importante nella guarigione delle ferite, nel rimodellamento tissutale e nella immunità di barriera. Le cellule T regolatorie (Tregs) sono indotte dal TGF- β . Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nella modulazione della tolleranza immunologica attraverso la produzione di TGF- β ed IL-10. Le cellule T helper follicolari (Tfh) canoniche presenti nei centri germinativi sono indotte nell'uomo da IL-12 ed IL-21. Negli ultimi anni sono state identificate diverse popolazioni di cellule Tfh-like nel sangue periferico umano. Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale di tipo *help* nei confronti dei B linfociti e nella risposta anticorpale.

Figura 2 Recettori per le citochine che contengono il recettore comune γ_c . Il recettore per la IL-21 è un membro di una famiglia di recettori che hanno in comune la catena γ_c . In aggiunta alla catena γ_c , ciascuno di questi recettori ha uno o più componenti specifici del recettore. Le citochine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ed IL-21 interagiscono con specifici recettori di membrana che hanno in comune la catena γ_c .

Figura 3 Interazioni cellulari e molecolari tra la cellula dendritica (DC), le cellule T helper follicolari (Tfh) ed i B linfociti. Le cellule T $CD4^+$ *naive* interagiscono con le cellule dendritiche nella cosiddetta zona T dei linfonodi o nelle zone interfollicolari. Nell'uomo la IL-12 è la più importante citochina prodotta dalle DC in grado di attivare STAT4 nei T linfociti $CD4^+$ per produrre IL-21. Questa citochina esercita un effetto autocrino interagendo con il recettore IL-21R sulle stesse cellule ed attivando STAT3 che induce la maturazione di queste cellule. Un iniziale fattore di trascrizione che viene espresso da queste cellule in via di maturazione è *Ascl2* e successivamente *BCL-6*. L'espressione sequenziale di questi fattori di trascrizione induce la maturazione completa delle cellule Tfh. In

particolare, questi fattori di trascrizione inducono la overespressione di CXCR5 e la down regolazione di CCR7. Le cellule Tfh migrano successivamente nella zona di confine tra T e B linfociti e si differenziano completamente nei centri germinativi. IL-6 prodotta dalle DC e dai B linfociti contribuisce alla iniziale attivazione di STAT3. IL-21 prodotta dalle cellule Tfh attiva il recettore IL-21R presente sui B linfociti inducendo l'espressione in queste cellule di BCL-6. Le cellule Tfh canoniche ed alcune sottopopolazioni di cellule *Tfh-like* del sangue periferico possono produrre anche IL-4 che attiva IL-4R presente sui B linfociti. Anche l'interazione fisica tra cellule DC e CD4⁺ e (ICOSL-ICOS) o tra cellule CD4⁺ e i B linfociti (CD28-CD86, ICOS-ICOSL, PD-1-PD-1L, CD40-CD40L, etc.) svolge un ruolo fondamentale nella maturazione e funzione delle cellule Tfh.

Figura 4 Rappresentazione schematica degli eventi cellulari e molecolari che si verificano nei linfonodi e che determinano la differenziazione dei B linfociti in plasmacellule. Le cellule dendritiche (DC) veicolano l'antigene legato ai complessi di istocompatibilità di classe

II (MHC classe II) e raggiungono i linfonodi attraverso i linfatici afferenti. Il complesso DC-antigene presenta, attraverso l'interazione con il *T cell receptor* (TCR), l'antigene ai T linfociti CD4⁺ negli organi linfoidi secondari. Le cellule DC inoltre forniscono segnali co-stimolatori (CD28/CD86 e OX40/OX40L) e IL-12. Questi segnali attivatori inducono la espressione di CXCR5 e la down regolazione di CCR7 sui T linfociti CD4⁺ consentendo loro di migrare verso i follicoli. In questa prima fase vi è l'espressione di *Ascl2*. Al confine della cosiddetta zona T-B, i T linfociti interagiscono con i B linfociti attivati presentanti l'antigene. In questa fase vi è la overespressione di BCL-6. Le cellule Tfh forniscono *help* ai B linfociti anche attraverso segnali co-stimolatori ed IL-21. In seguito all'interazione nella zona T-B, i B linfociti possono differenziarsi in plasmablasti a breve emivita extrafollicolari o entrare nei centri germinativi. Nell'ambito dei centri germinativi, le cellule Tfh esprimenti elevati livelli di CXCR5 e BCL-6, continuano a fornire help ai B linfociti consentendo la differenziazione di plasmacellule che producono anticorpi della classe IgM, IgA ed IgG.

Figura 5 Sottopopolazioni di cellule Tfh nel sangue periferico umano secondo la classificazione di Morita *et al.* (2011). I linfociti CD4⁺ CXCR5⁺ del sangue periferico comprendono almeno 3 sottopopolazioni fenotipicamente e funzionalmente distinte. In particolare, è possibile identificare cellule Th1-like, Th2-like e Th17-like. Le cellule Th1-like sono CXCR5⁺ CXCR3⁺ e CCR6⁻, esprimono T-bet e producono IFN- γ ; queste cellule non inducono *in vitro* la produzione di immunoglobuline dai B linfociti. Le cellule Th2-like sono CXCR5⁺ CXCR3⁻ CCR6⁻, esprimono GATA3 e producono IL-21 in aggiunta a citochine Th2-like (IL-4, IL-5 e IL-13); queste cellule inducono la produzione di anticorpi IgG, IgM, IgA ed IgE. Le cellule Th17-like sono CXCR5⁺ CXCR3⁻ CCR6⁺; esprimono ROR γ t e producono IL-21 in aggiunta a citochine Th17-like (IL-17A e IL-22). Queste cellule inducono *in vitro* la produzione di IgM, IgA, IgG, ma non di IgE.

Figura 6 Rappresentazione schematica delle diverse sottopopolazioni di cellule del sangue periferico Tfh-like secondo Locci *et al.* (2012) e He *et al.* (2013) e. I T linfociti CD4⁺ CXCR5 possono essere ulteriormente

suddivisi in 6 sottopopolazioni in base alla espressione di CXCR3, CCR7 e PD-1. L'espressione di CCR7 è inversamente correlata con l'espressione di PD-1. Le cellule PD-1⁺ che esprimono ICOS rappresentano cellule Tfh-like attivate. Viceversa, le cellule PD-1⁺ e CXCR3⁻ rappresentano cellule Tfh quiescenti e sono in grado di fornire *help* ai B linfociti.

Figura 7 Rappresentazione schematica di un modello di sintesi di IgE nell'uomo. I T linfociti CD4⁺ ed i B linfociti interagiscono nella regione T-B dei linfonodi. Le cellule Tfh in via di differenziazione sono localizzate in prossimità dei follicoli. Le cellule Tfh presenti nei centri germinativi sono ulteriormente polarizzate ed esprimono i più alti livelli di BCL-6 e CXCR5. La risposta immunologica IgE precoce scaturisce da plasmacellule a bassa affinità ed a breve emivita esprimenti IgE e generate in siti extrafollicolari. Viceversa, le risposte IgE tardive nascono da reazioni che avvengono nei centri germinativi. Nell'ambito dei centri germinativi, le cellule Tfh forniscono *help* a B linfociti attivati che possono andare incontro ad uno *switch* isotipico diretto (Direct CSR) (da

IgM all'isotipo IgE) o sequenziale (Sequential CSR) (da IgM ad IgG e quindi ad IgE). I B linfociti IgE⁺ presenti nei centri germinativi vanno incontro a mutazioni somatiche e si differenziano in plasma cellule IgE⁺ a breve emivita che producono IgE ad elevata affinità. Alcuni B linfociti IgE⁺ presenti nei centri germinativi possono differenziarsi in plasmacellule IgE⁺ a lunga emivita che migrano nel midollo osseo. Altri B linfociti IgE⁺ si differenziano in B linfociti della memoria IgE⁺.

Figura 8 Effetto della IL-21 sulla sintesi di IgE totali dai *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs). I PBMC isolati dal sangue periferico di soggetti con rinite allergica stagionale (SAR) venivano incubati in presenza di CD40L (100 ng/ml) e di IL-4 (100 ng/ml) alla concentrazione di 500.000 cellule/pozzetto. A sinistra è possibile osservare che l'aggiunta di IL-21 aumenta significativamente la produzione di IgE totali valutata dopo 6 giorni di incubazione. A destra è possibile osservare che l'aggiunta di IL-4 potenzia la sintesi di IgE indotta da CD40L. Inoltre, l'aggiunta di IL-21 incrementa in maniera significativa la

produzione di IgE totali indotta dalla combinazione di CD40L + IL-4.

Figura 9 Effetto di dosi crescenti di IL-21 (1-100 ng/ml) sulla sintesi di IgE totali dai B linfociti *naive* (CD19⁺, CD27⁻), sui B linfociti della memoria (CD19⁺, CD27⁺) e plasmacellule (CD138⁺) purificati dal sangue periferico di 6 pazienti con rinite allergica stagionale (SAR). I dati rappresentano la media \pm SD di 6 esperimenti indipendenti.

***p<0.001 se confrontati con il gruppo di controllo senza l'aggiunta di IL-21.

Figura 10 Confronto tra *Rhinitis Total Nasal Symptoms Scores* (RTSS) in pazienti con rinite allergica stagionale (SAR) ed in soggetti di controllo non allergici (NA).

***p<0.001 se confrontati tra i due gruppi.

Figura 11 Comparazione tra la percentuale di cellule Tfh-like isolate dal sangue periferico di pazienti con rinite allergica stagionale (SAR) (colonne nere) e soggetti non allergici (NA) (colonne bianche) valutate attraverso l'analisi citofluorimetrica.

***p<0.001 se confrontati tra i due gruppi.

Figura 12 Percentuale di linfociti esprimenti mRNA per IL-21 nel sangue periferico di pazienti con rinite allergica stagionale (SAR) (colonna nera) ed in soggetti di controllo non atopici (NA) (colonna bianca) valutata attraverso RT-PCR.

***p<0.001 se confrontati tra i due gruppi.

Figura 13 Correlazione lineare tra la sintesi *in vitro* di IgE totali e la percentuale di cellule *Tfh-like* nel sangue periferico di pazienti con rinite allergica stagionale. Ciascun punto rappresenta i valori ottenuti in un singolo donatore.

XIV. FIGURE

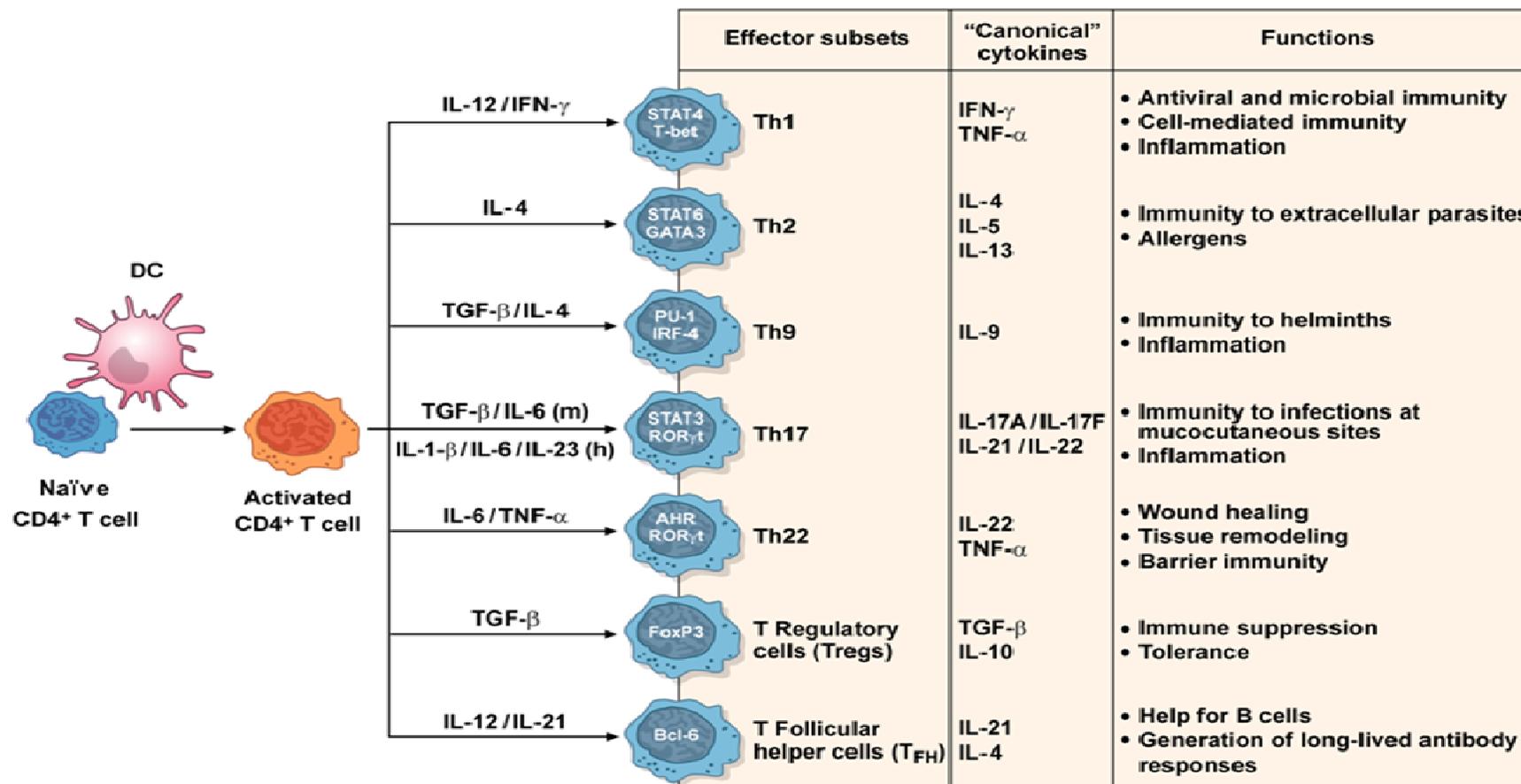


Fig. 1

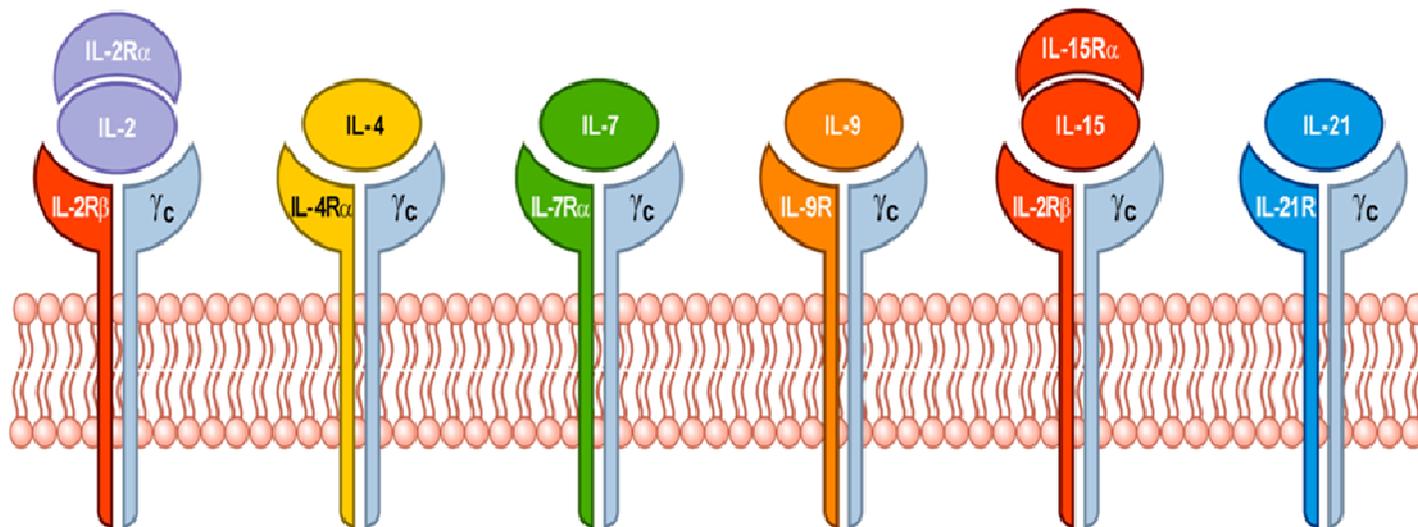


Fig. 2

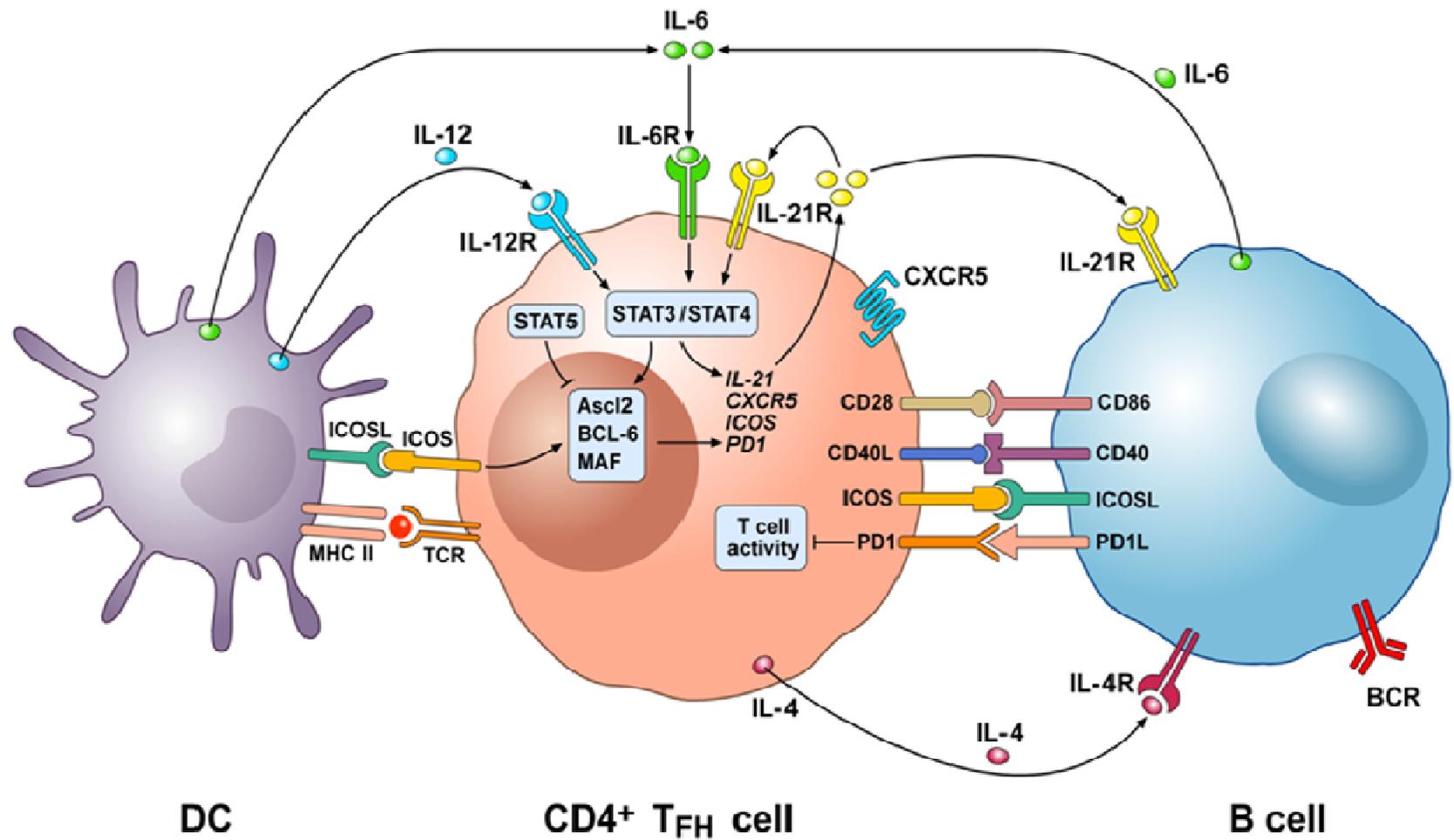


Fig. 3

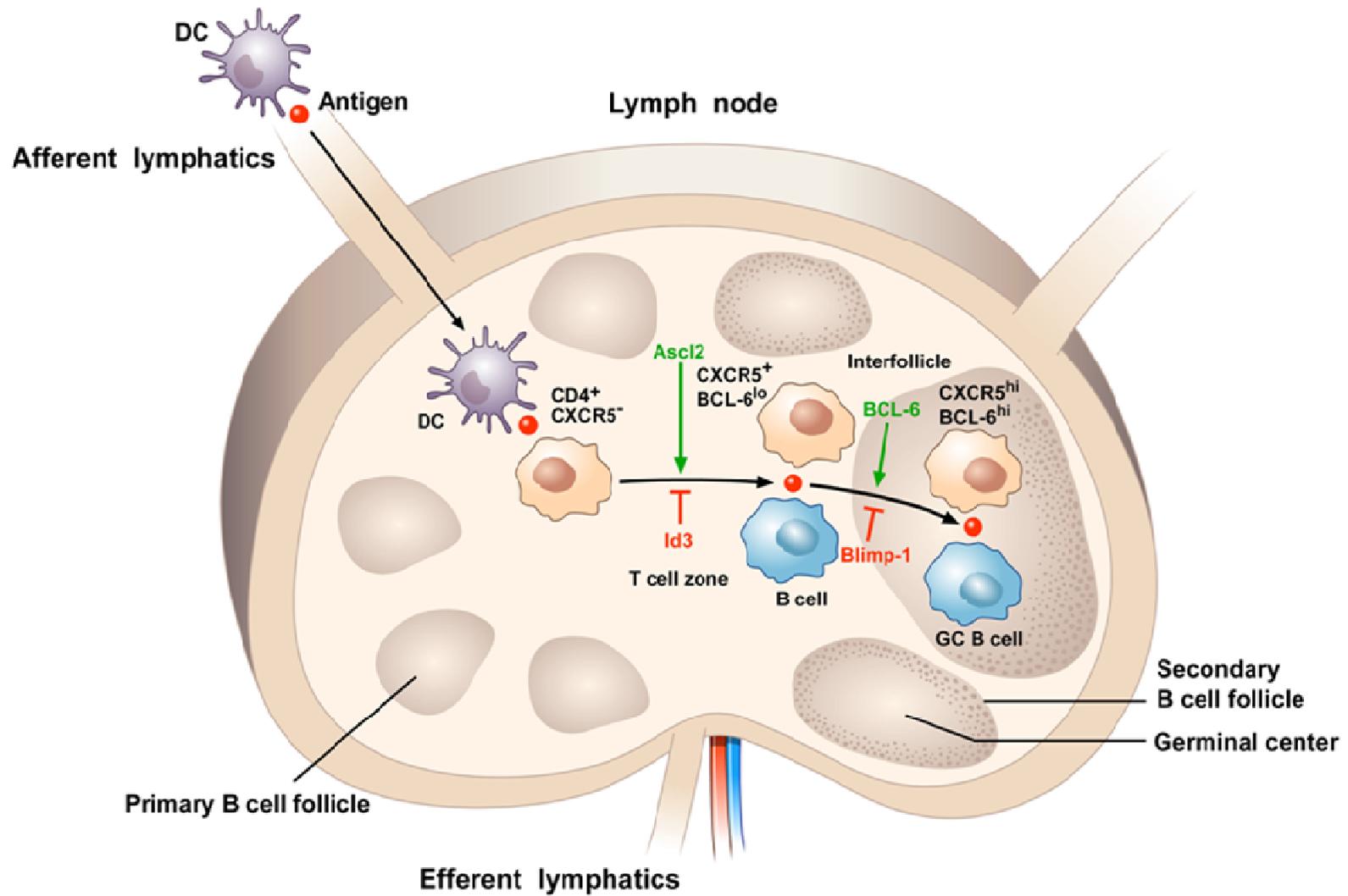
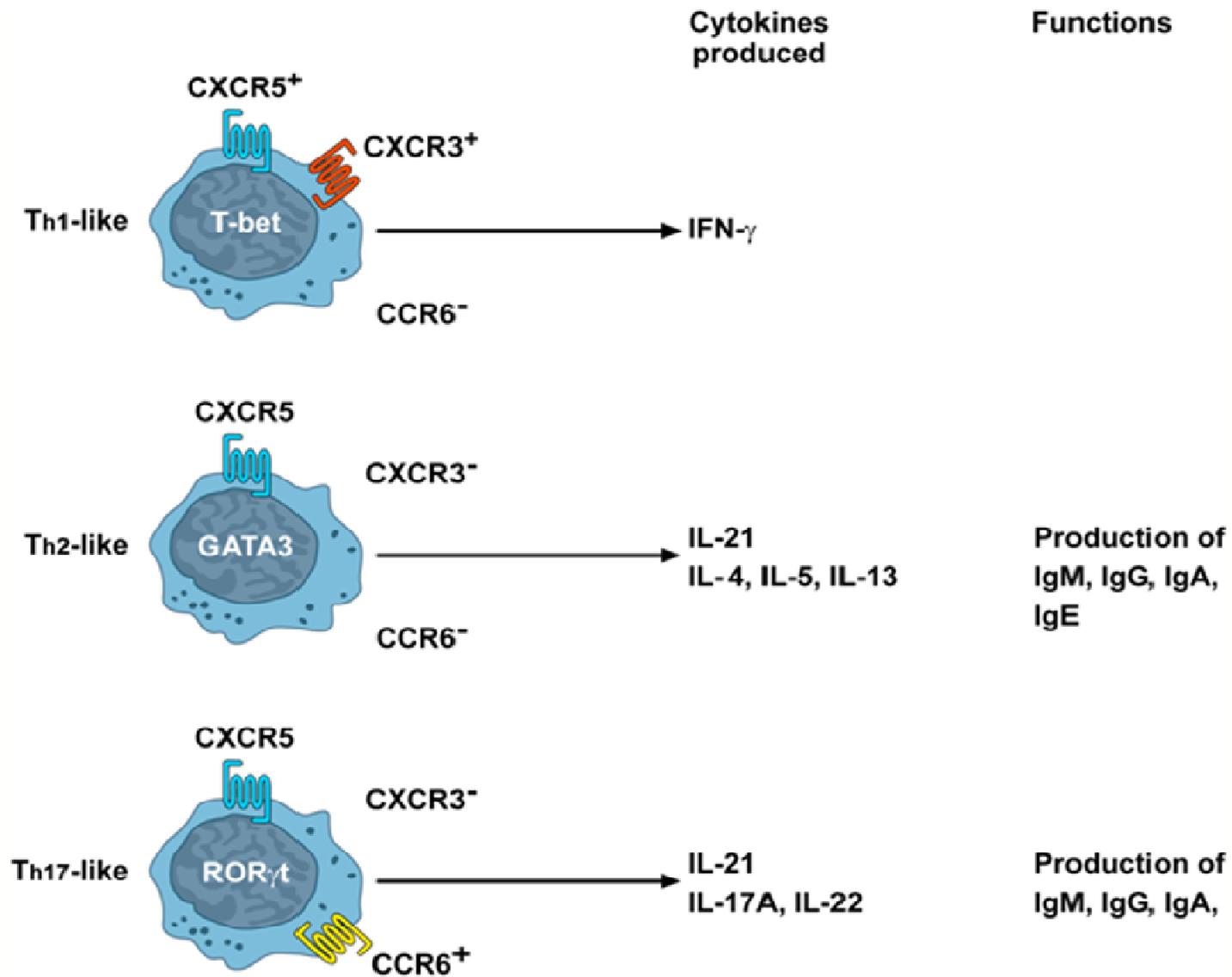


Fig. 4



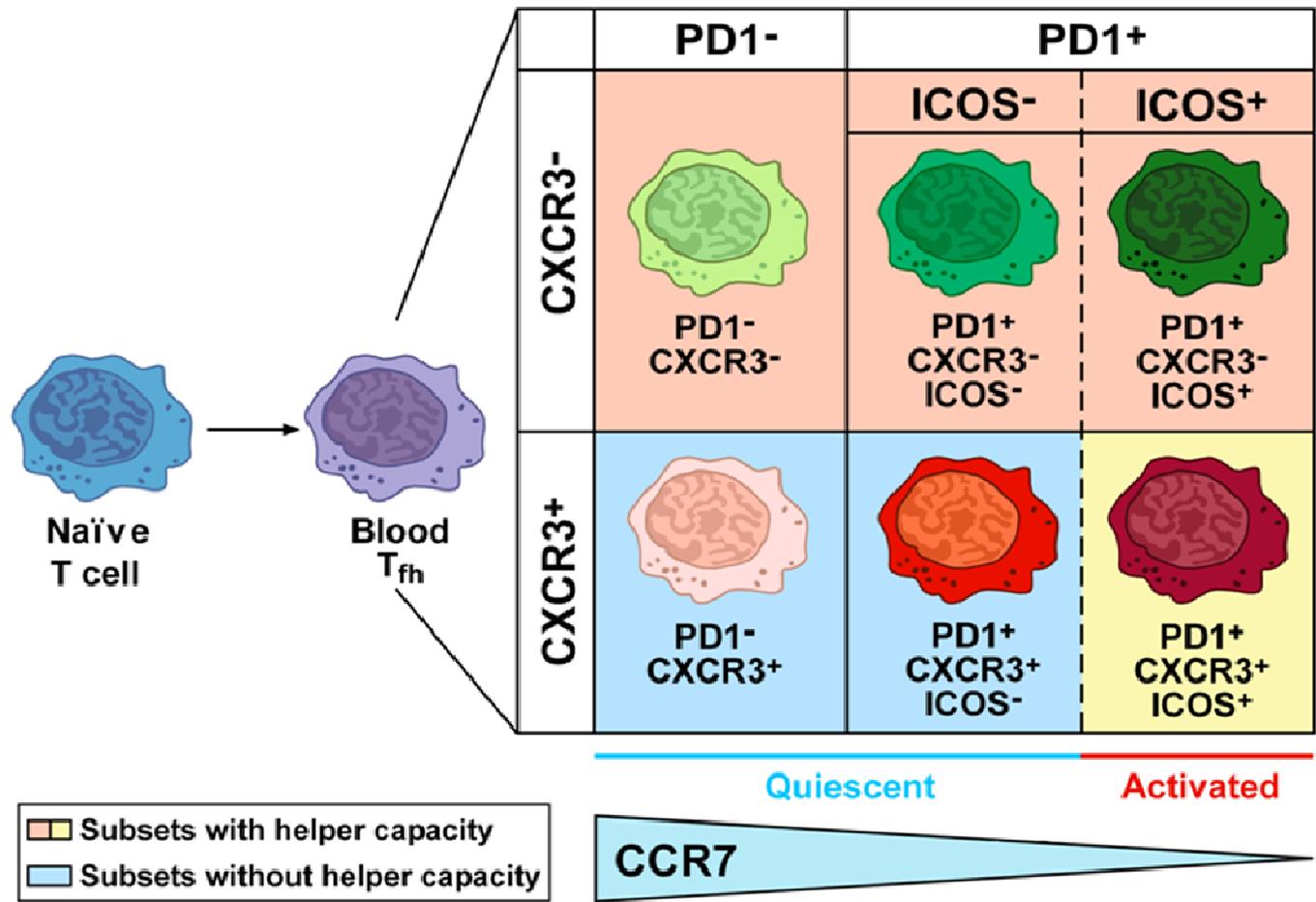


Fig. 6

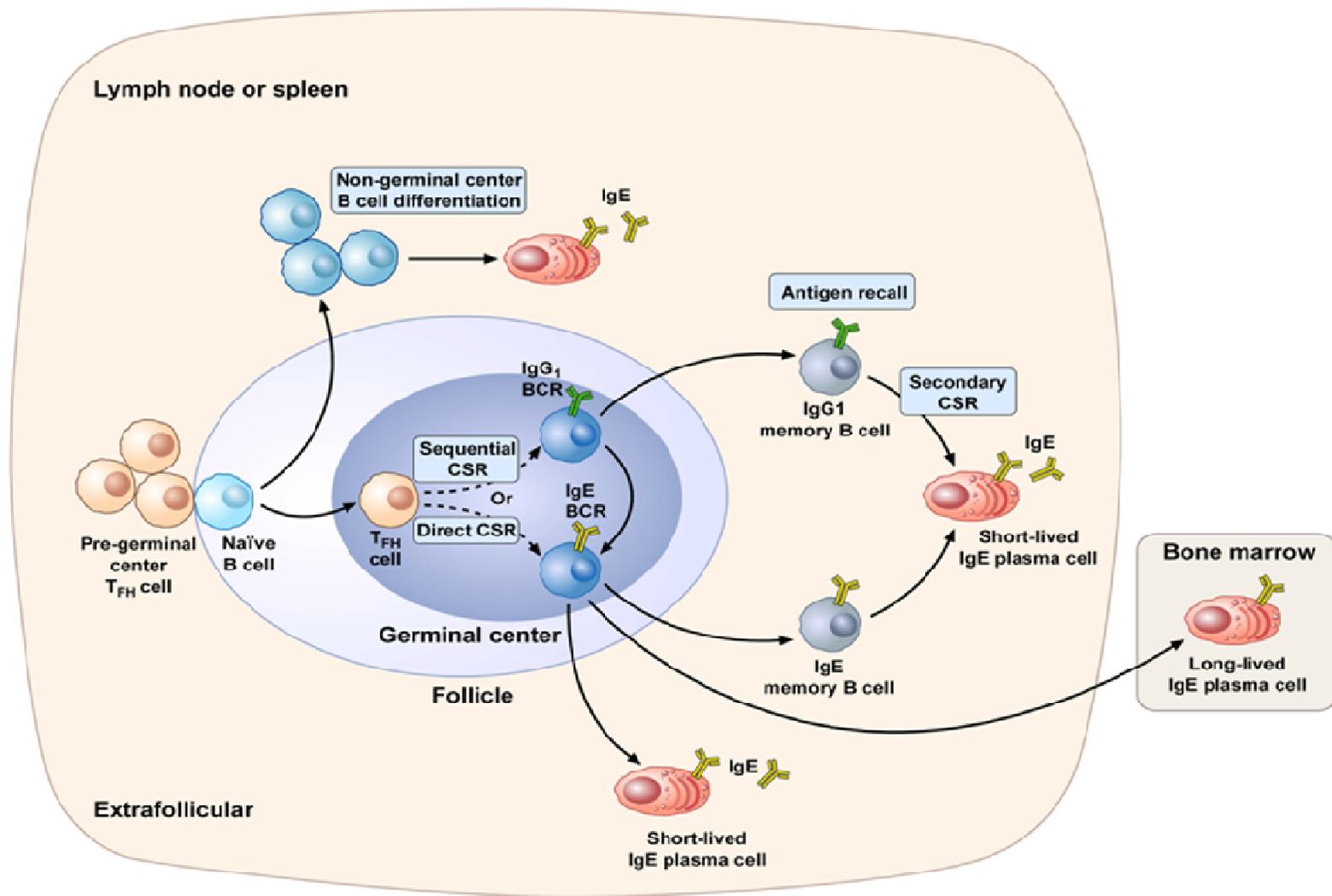
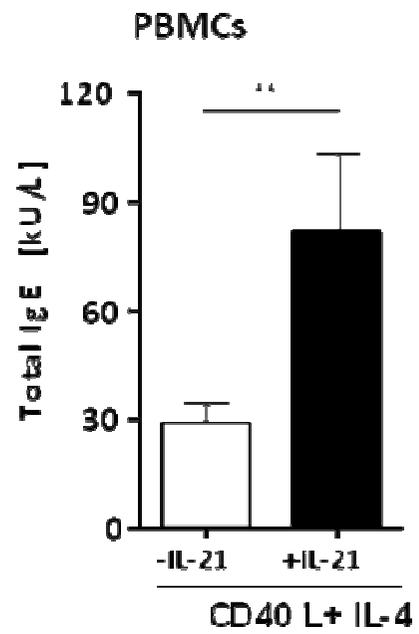
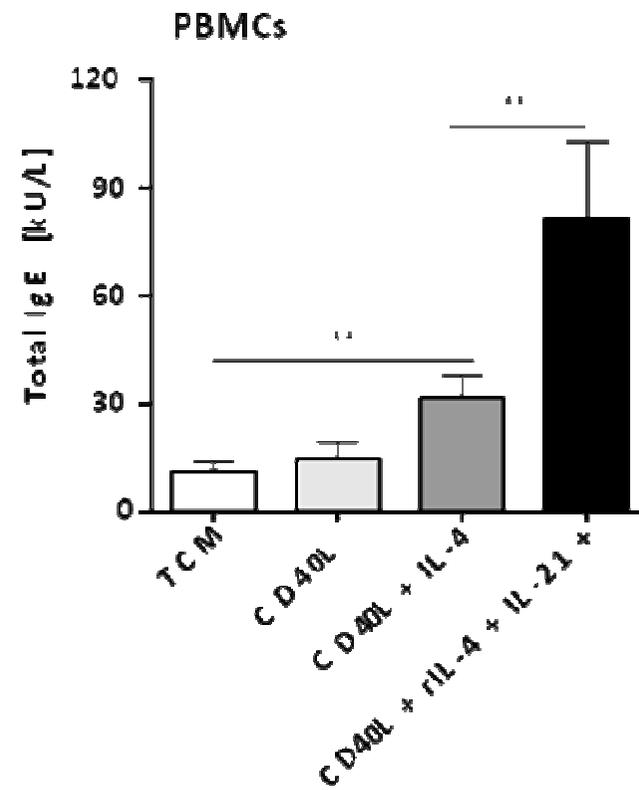


Fig. 7



** $p < 0.01$



** $p < 0.01$

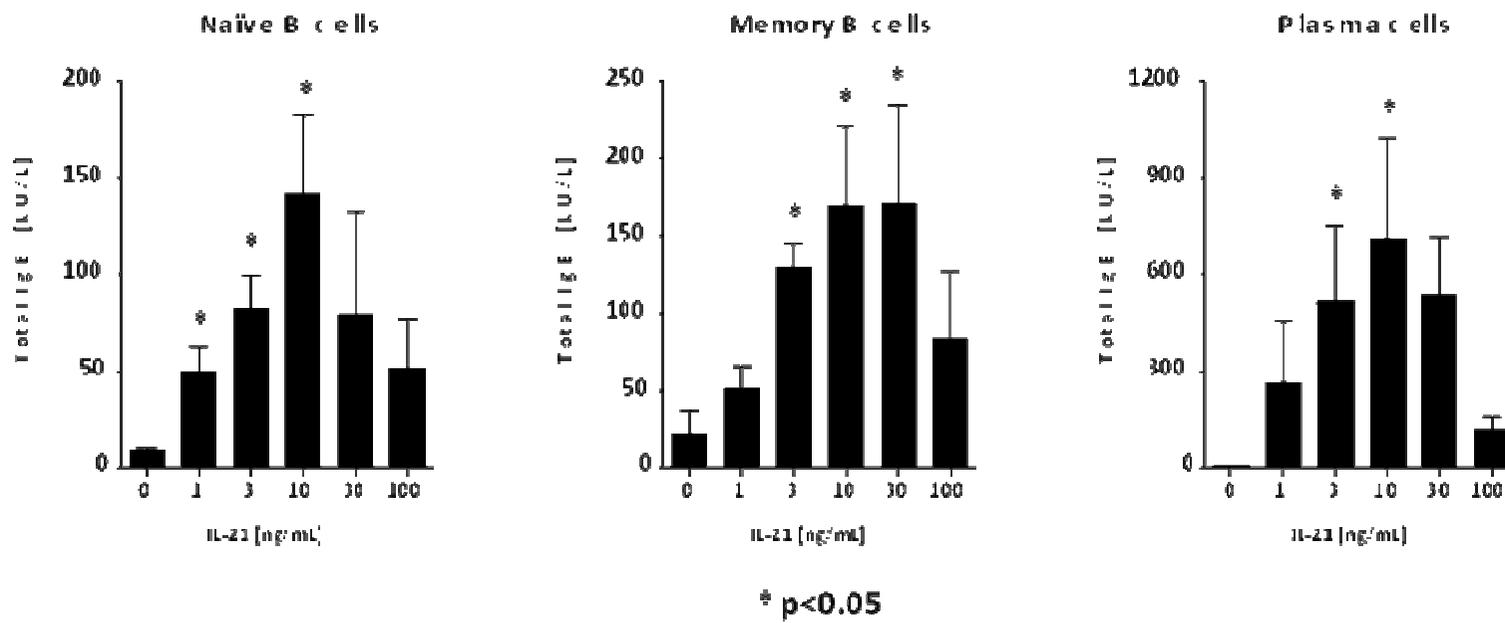


Fig. 9

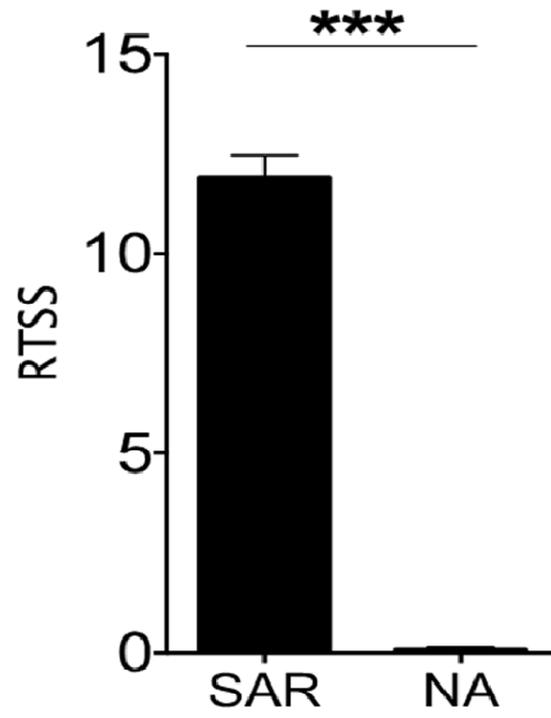


Fig. 10

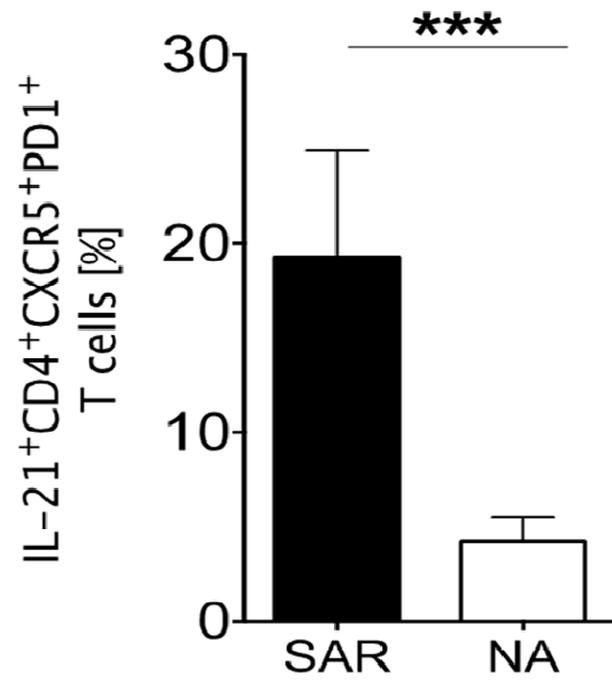


Fig. 11

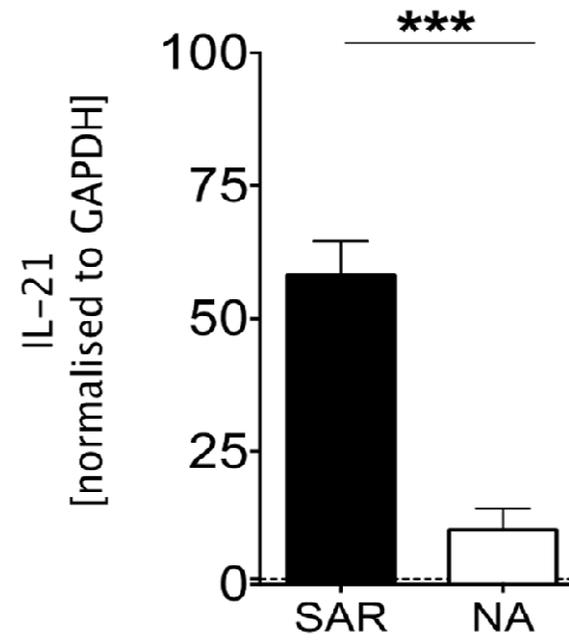


Fig. 12

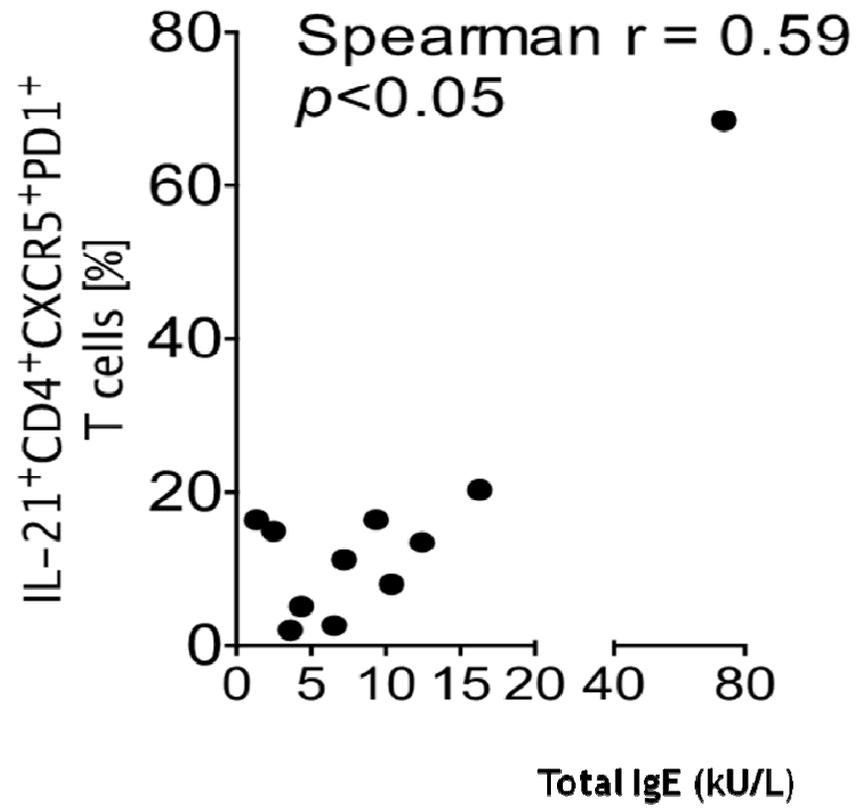


Fig. 13