

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare

“L. Califano”

Dottorato in Genetica e Medicina Molecolare XVII ciclo

Coordinatore Prof. Carmelo Bruno Bruni

Tesi di dottorato

Risposta Immunitaria e Timoma:  
Patogenesi della Sindrome Di Good

Coordinatore del Dottorato  
Prof. Carmelo Bruno Bruni

Candidata  
Dott. Laura Vitiello

Supervisore  
Prof. Luigi Racioppi

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

## Indice

Scopo della tesi	pag.3
Introduzione	pag.4
1. <i>Struttura e funzioni del timo.</i>	pag.5
2. <i>Tumori Timici e Timoma</i>	pag.9
3. <i>La Sindrome di Good</i>	pag.12
Pazienti, materiali e metodi	pag.15
Risultati	pag.21
Discussione	pag.29
Tabelle e Figure	Pag.36
Bibliografia	pag.57

## **Scopo della tesi.**

Il timoma è un raro tumore umano, originante dalle cellule epiteliali timiche, caratterizzato da una notevole associazione con disturbi del sistema immune che includono patologie autoimmuni e una severa forma di immunodeficienza. Gli aspetti immunobiologici associati ai timomi rendono questa patologia un modello unico per lo studio del ruolo del timo e dell'omeostasi linfocitaria in individui adulti. In particolare, in circa il 10% dei casi di timoma, i pazienti sviluppano un'immunodeficienza severa caratterizzata da infezioni ricorrenti, principalmente a carico dell'apparato respiratorio, che possono rivelarsi letali per il paziente. Questa condizione patologica, nota come sindrome di Good, rappresenta ancora oggi una condizione a patogenesi non definita.

Lo scopo di questo studio è stato quello di definire gli aspetti patogenetici dell'immunodeficienza associata a timoma, caratterizzando una coorte di 50 pazienti, dei quali sono stati valutati lo stato e la funzionalità del sistema immunitario sia con metodiche di analisi convenzionali che con approcci molecolari più avanzati.

## Introduzione

Il sistema immunitario rappresenta il principale meccanismo di difesa dell'organismo contro i patogeni, accanto alle barriere chimiche e fisiche rappresentate dalla pelle e dalle mucose. Gli organi e le cellule che lo compongono garantiscono una risposta rapida, efficace e in molti casi completamente protettiva verso i numerosi microorganismi, quali batteri, virus, funghi e parassiti eucarioti, potenzialmente patogenici, con cui siamo costantemente a contatto<sup>1,2</sup>. Classicamente, si parla di due tipi di immunità, una deputata al riconoscimento di motivi molecolari conservati, e l'altra al riconoscimento specifico di strutture molecolari altamente variabili<sup>3</sup>. Queste due componenti del sistema immunitario sono chiamate innata e adattativa, rispettivamente<sup>4,5</sup>. La risposta immunitaria da parte dell'immunità adattativa generalmente segue quella innata, così come è accaduto durante l'evoluzione<sup>6</sup>.

L'immunità innata e quella adattativa differiscono sia nelle modalità di riconoscimento dei patogeni che nella capacità di rispondere a successive stimolazioni. Contrariamente alla risposta innata, la risposta adattativa è generata in modo da indurre e mantenere la *memoria* immunitaria, caratteristica su cui si basano le vaccinazioni. La risposta adattativa coinvolge i linfociti T e B, che, attraverso i loro recettori (TCR, *T cell receptor* e BCR, *B cell receptor*) riconoscono i peptidi antigenici. Questi recettori sono generati tramite riarrangiamenti somatici del DNA che garantiscono la formazione di una molecola unica per ogni singolo clone linfocitario. L'espansione di un clone linfocitario in seguito all'incontro con l'antigene garantisce il mantenimento della memoria

immunitaria e la maggiore rapidità delle successive risposte ad un determinato patogeno<sup>7,8,9</sup>.

I linfociti B e i T originano nel midollo osseo da un precursore linfocitario comune, ma mentre le cellule B completano il loro sviluppo nel midollo osseo, dal quale escono come linfociti maturi, i precursori delle cellule T migrano nel timo, che rappresenta così il sito primario della linfopoiesi T<sup>10</sup>.

### *Struttura e funzioni del timo.*

Il timo è un organo bilobato situato nel mediastino anteriore; ogni lobo è suddiviso da setti fibrosi in molteplici lobuli, formati da una zona corticale esterna ed una zona midollare interna. La zona corticale è composta da un denso agglomerato di linfociti T, mentre la zona midollare, più chiara alla colorazione con ematossilina e eosina, è meno densamente popolata da linfociti<sup>3</sup>. Disseminate in tutto il tessuto timico si trovano cellule epiteliali (stroma timico<sup>4</sup>), macrofagi e dendritiche, presenti soprattutto nella zona midollare. Nella zona midollare si ritrovano i corpuscoli di Hassal, formati da cellule epiteliali strettamente impacchettate. Il timo possiede una ricca vascolarizzazione, nonché vasi linfatici efferenti che portano ai linfonodi mediastinici<sup>3</sup>.

Durante lo sviluppo embrionale, dal foglietto endodermico prende origine un rudimentale abbozzo timico<sup>11</sup>, che viene rapidamente colonizzato da cellule di origine ematopoietica, tra cui cellule dendritiche, macrofagi e precursori dei timociti<sup>3</sup>. Lo studio dei modelli murini ha permesso di identificare nel fattore trascrizionale FoxN1 uno dei regolatori chiave nello sviluppo del timo: FoxN1 correla con lo stato di specializzazione delle cellule epiteliali timiche (TEC, thymic epithelial cells) ed è necessario per il reclutamento dei precursori dei linfociti e per

l'ulteriore specializzazione delle TEC corticali e midollari<sup>12,13,14</sup>. La proliferazione delle TEC midollari è guidata, tra gli altri fattori, dal fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)-7, noto anche come fattore di crescita dei cheratinociti<sup>12</sup>, e dal recettore per la linfoxina beta (LTβR)<sup>15</sup>.

Poco si conosce delle chemochine che regolano il reclutamento dei precursori dei timociti al timo prima della nascita, ma nei topi *knock-out* per CCR7 e CCR9 si osservano alterazioni nello sviluppo del timo e nel reclutamento dei pre-timociti<sup>12</sup>, suggerendo che, come nella vita post-natale, questi recettori per le chemochine guidino il movimento dei progenitori delle cellule T verso il timo e, attraverso la zona corticale, fino alla midollare timica<sup>16</sup>.

Come mostra la [figura 1](#), i precursori delle cellule T arrivati nel timo vanno incontro ad una serie di processi di differenziamento ben documentati, che sono tipicamente definiti basandosi sull'espressione in membrana delle molecole CD4 e CD8. I timociti sono inizialmente doppi negativi (DN) CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, poi diventano doppi positivi CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (DP), e infine cellule singolo-positive (SP), CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup><sup>11, 18</sup>. Lo stadio di DN può essere ulteriormente suddiviso sulla base dell'espressione delle molecole CD25 e CD44. Recenti evidenze mostrano come il movimento dei linfociti sia tutt'altro che lineare: i progenitori linfoidi entrano nel timo a livello della giunzione cortico-midollare, migrano verso la corteccia esterna, e infine ritornano alla zona midollare dove vanno incontro ai processi di selezione positiva e negativa<sup>19</sup>.

I processi di selezione positiva e negativa<sup>94</sup>, necessari ad un corretto sviluppo dei linfociti, si basano rispettivamente sul riconoscimento delle molecole del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC) e sul riconoscimento dei complessi formati da molecole MHC e da peptidi autologhi<sup>2</sup>. Il primo processo è mediato dalle cellule epiteliali timiche,

mentre nel secondo sono coinvolte principalmente le DC e i macrofagi. La selezione positiva assicura che tutte le cellule T mature siano in grado di riconoscere le molecole MHC autologhe, e di rispondere ai peptidi derivanti dai patogeni presentati su queste molecole. La selezione negativa, invece, elimina le cellule autoreattive e rappresenta il principale meccanismo di induzione della tolleranza centrale<sup>1</sup>.

Durante la maturazione timica, i precursori dei linfociti T riarrangiano il loro DNA al livello dei locus genici per le catene del recettore delle cellule T (TCR)<sup>1</sup>. I segmenti genici del TCR sono organizzati in maniera simile a quelli delle immunoglobuline (Ig). Le regioni codificanti per il TCR, così come quelle delle immunoglobuline, vanno incontro a sostanziali processi di riarrangiamento genico nel corso del processo differenziativo utilizzando enzimi e meccanismi comuni<sup>1</sup>. Il meccanismo che porta al riarrangiamento di ricombinazione è simile a quello dei geni per le Ig, infatti nel locus TCR si ritrovano le stesse sequenze conservate di sette e nove nucleotidi adiacenti alle regioni V, D e J e gli spaziatori di dodici o ventitrè nucleotidi, descritti inizialmente per le immunoglobuline. L'alta variabilità degli eterodimeri TCR<sup>93</sup> viene assicurata dall'utilizzo di differenti segmenti genici V, D e J, diversamente combinati tra loro, dall'appaiamento casuale delle catene  $\alpha/\beta$  e dall'attività della deossiribonucleotidil-tranferasi terminale (TdT) che aggiunge nucleotidi in maniera casuale nelle regioni di giunzione.

L'attività timica può essere valutata misurando la percentuale di linfociti *naive*, neo-emigrati dal timo (RTE, *Recent Thymic Emigrants*)<sup>2</sup>. Classicamente, i linfociti *naive* sono stati identificati e distinti dai linfociti della memoria (*memory*) sulla base dell'espressione delle isoforme della molecola CD45, prodotte in seguito a *splicing* alternativo<sup>2</sup>. In particolare, le cellule *naive* sono state definite CD45RA+, e le *memory* CD45RO+.

Successivamente, è stato proposto l'utilizzo combinato di altri marcatori di superficie, come CCR7<sup>27</sup>, CD62L<sup>28</sup>, e, specialmente per la determinazione dei linfociti CD8 *naive*, la valutazione dell'espressione delle molecole CD27<sup>29,31</sup>, CD28<sup>33,29</sup>, CD7<sup>32</sup> e CD11a<sup>29,30</sup>. L'analisi più fine del fenotipo delle cellule *naive* è stata resa necessaria dall'evidenza che i linfociti CD8 effettori, cioè quelli che sono attivati in risposta ad un antigene, continuano ad esprimere CD45RA, ma a differenza delle cellule *naive* perdono i marcatori CD62L, CD27 e CD28, mentre esprimono ad alti livelli CD11a<sup>29,30,31</sup>.

La misurazione dell'*output* timico può essere effettuata anche misurando i TREC<sup>34, 35, 36</sup> (TCR delta excision circle), che sono dei frammenti di DNA circolare escissi durante il riarrangiamento dei geni della catena  $\alpha$  del TCR. Questi frammenti non sono replicati con il DNA genomico, e la misura quantitativa del numero di TREC in una popolazione linfocitaria è un indice del numero di cicli di proliferazione cui sono andate incontro le cellule<sup>36</sup>.

Con l'età, la perdita graduale della struttura e della funzionalità timica (involuzione timica) causa un declino nel numero di linfociti maturi emessi dal timo, e quindi una riduzione delle cellule T *naive* in periferia<sup>21, 22</sup>. Nei soggetti sani generalmente questo non è causa di patologie, mentre possono sorgere problemi in soggetti con immunodeficienze secondarie a chemio- o radioterapie, od ad infezione da HIV<sup>12</sup>. È stato proposto che al mantenimento del *pool* di linfociti periferici contribuiscano, in maniera dipendente dall'età, le RTE e i linfociti già presenti in periferia, che vanno incontro a proliferazione omeostatica<sup>23</sup>. Le cellule T generate dalla timopoiesi hanno un repertorio TCR completo, virtualmente capace di rispondere a qualsiasi antigene. Di contro, la proliferazione periferica dei linfociti già presenti potrebbe portare all'espansione di repertori TCR pre-



esistenti<sup>24-26</sup>. In assenza di un'attiva timopoiesi, l'espansione periferica dei linfociti T viene favorita<sup>23</sup>. La proliferazione omeostatica è favorita dalla presenza di IL-7, che in soggetti sani favorisce il mantenimento di un *pool* di linfociti *naive* e di un pool di linfociti della memoria, mentre in soggetti linfopenici induce, accanto alla proliferazione delle cellule della memoria, la proliferazione e il differenziamento delle naive in linfociti memory, sbilanciando a favore di questi ultimi la composizione dei linfociti circolanti<sup>37</sup>.

### *Tumori timici e Timoma.*

I tumori timici comprendono i carcinomi timici, più aggressivi, e i timomi, che hanno una prognosi più favorevole<sup>38</sup>. Generalmente originano dalle cellule epiteliali, piuttosto che dalle cellule linfoidei<sup>39</sup>. Si possono distinguere tre gruppi di tumori timici: i timomi, che non hanno caratteristiche citologiche di malignità<sup>40</sup>; un gruppo intermedio, che identifica i tumori solitamente chiamati “carcinomi timici ben differenziati” (Well Differentiated Thymic Carcinomas, WDTC), che hanno le caratteristiche organotipiche dei timomi ma possono presentare atipia e figure mitotiche<sup>41</sup>; e i carcinomi timici, che hanno molte figure mitotiche e altri segni citologici di malignità<sup>42</sup>.

I carcinomi timici rappresentano un piccolo (10%) gruppo di tumori timici, ben distinto dai timomi. Sono generalmente sintomatici a causa dell'invasione a danno dei tessuti circostanti<sup>43</sup>, di solito non si associano alla presenza di *Myasthenia Gravis* (MG), e sono più aggressivi rispetto ai timomi<sup>44</sup>.

La classificazione dei WDTC come gruppo a sé stante è controversa<sup>38</sup>, per le loro caratteristiche a metà strada tra i timomi e i

carcinomi timici. I tassi di sopravvivenza sono simili a quelli dei carcinomi timici<sup>45</sup>, mentre la *Myasthenia gravis* è spesso presente, come nei timomi<sup>43</sup>.

La grande maggioranza dei timomi è invece composta da tumori citologicamente blandi, con una prognosi più favorevole rispetto ai carcinomi timici<sup>38</sup>. Sono state proposte molte classificazioni istologiche, ma raramente correlano con il quadro clinico. La classificazione più recente è quella proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità<sup>46</sup>. Questo sistema suddivide i tumori timici in 6 sottogruppi (A, AB, B1, B2, B3, e C). I tumori di tipo A sono composti da cellule epiteliali fusate senza segni di atipia. I tumori di tipo AB sono simili al tipo A, ma presentano foci di linfociti neoplastici. I tumori di tipo B sono composti da cellule epitelioidi, e sono suddivisi in tre sottotipi a seconda della proporzione tra cellule epiteliali e linfociti. I tumori di tipo C sono i carcinomi timici.

Il sistema di stadiazione più comunemente accettato è quello proposto da Masaoka<sup>47</sup>, che prevede sei stadi (I, IIa, IIb, III, IVa, IVb) e si basa sull'invasione macro- o microscopica nelle strutture del mediastino. I tumori allo stadio I sono capsulati e non presentano segni di invasività; quelli allo stadio IIa presentano invasioni macroscopiche nel tessuto adiposo circostante o nella pleura, mentre quelli allo stadio IIb presentano micro-invasioni. Lo stadio III è caratterizzato da invasioni macroscopiche negli organi vicini, e agli stadi IVa e IVb si osservano metastasi rispettivamente pleuriche o pericardiche, oppure ematiche e linfatiche<sup>38</sup>.

L'incidenza del timoma è simile nei maschi e nelle femmine, e l'età di comparsa è piuttosto varia, anche se c'è un picco tra la terza e la quarta decade di vita<sup>38</sup>. Circa un terzo dei pazienti è asintomatico, mentre gli altri possono presentare sintomi legati alla massa intratoracica, oppure avere una sintomatologia sistemica, o sintomi legati alla MG<sup>48, 49</sup>.

I timomi sono associati a varie sindromi paraneoplastiche, generalmente di natura autoimmune<sup>50,51</sup>. La *Myasthenia Gravis* è la più comune di queste, e si ritrova in circa il 45% dei pazienti con timoma<sup>52</sup>. L'aplasia eritroide<sup>53,54</sup> (*Pure Red Cell Aplasia*, PRCA) e l'ipogammaglobulinemia<sup>70, 55, 56, 57, 58</sup> si ritrovano in circa il 5-10% dei pazienti. Altre condizioni, come la polimiosite<sup>62</sup>, il Lupus eritematoso Sistemico<sup>61</sup>, l'artrite reumatoide<sup>63</sup>, la tiroidite<sup>59</sup>, la colite ulcerosa<sup>64</sup>, sono state descritte in pazienti con timoma ma sono meno frequenti. Altri studi hanno descritto la presenza contemporanea di altri tumori secondari al timoma<sup>60</sup>. Al timoma si associano diverse alterazioni del sistema immunitario, come l'inversione del rapporto CD4/CD8 e l'aumento dei linfociti T CD8+ CD45RA+<sup>86</sup>. I timomi sono inoltre in grado di generare cellule T mature<sup>87</sup>. Recentemente, da due gruppi diversi sono state descritte diminuzioni del numero di linfociti T regolatori (Treg) CD4+ CD25+ intratimici<sup>95,96</sup> in pazienti con timoma e MG: la perdita selettiva delle Treg potrebbe essere correlata all'insorgenza delle patologie autoimmuni associate al timoma.

La diagnosi di timoma è basata sull'osservazione radiografica di una massa nel mediastino anteriore ([figura 2](#)). Generalmente questo è sufficiente per porre diagnosi di timoma, mentre è necessaria una biopsia quando ci siano i sintomi di un linfoma o sia necessario un trattamento chemioterapico prima della rimozione chirurgica del tumore<sup>38</sup>. Recentemente, è stato dimostrato che la scansione con l'octreotide garantisce una specificità del 100%<sup>65</sup>.

La rimozione chirurgica è il principale trattamento per il timoma, perchè la maggioranza (90-95%) di questi tumori è ben localizzata. La resezione completa del timo è giustificata perchè rappresenta il fattore prognostico più rilevante<sup>38</sup>.

La sopravvivenza a 5 anni è piuttosto buona, indipendentemente dallo stadio del tumore, mentre a 15 anni scende dall'80% all'8% a seconda dello stadio (dal I al IV, rispettivamente)<sup>38</sup>.

La relativa scarsa frequenza dei timomi, e la mancanza di linee cellulari umane di timoma hanno reso difficile l'analisi genetica di questi tumori. Studi recenti, tuttavia, dimostrano l'esistenza di una correlazione tra lo stadio del tumore e l'aumento dell'espressione di determinati geni, come c-Jun<sup>66</sup> (associato ad un aumento della proliferazione), Arg e DAP3<sup>67</sup> (associati alla resistenza alle radiazioni ionizzanti). Sono state riportate anche alterazioni cromosomiche, come duplicazioni<sup>67</sup>, delezioni<sup>68</sup> e traslocazioni<sup>69</sup>.

### *La Sindrome di Good*

Un'associazione tra timoma e immunodeficit è stata descritta per la prima volta nel 1956 da Robert A. Good, che riportò il caso clinico di un'ipogammaglobulinemia secondaria a timoma<sup>70, 71</sup>. Il paziente descritto da Good fu sottoposto a rimozione del timo, e l'analisi istologica rivelò la presenza di cellule epiteliali "fusate" ([figura 2](#)), completamente differenti dal tessuto timico normale. Accanto all'ipogammaglobulinemia, il paziente presentava altri deficit collegati all'immunità cellulare, che non vennero risolti dalla timectomia. L'osservazione di un'associazione tra anomalie timiche e immunodeficienza portò il gruppo di Good ad approfondire gli studi sul timo, in pazienti e in modelli murini, per chiarirne il ruolo nel sistema immunitario<sup>72</sup>.

La definizione di questa sindrome è ancora piuttosto controversa, e nonostante sia riconosciuta come un'entità distinta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità<sup>73</sup>, non esistono ancora criteri formali per la diagnosi<sup>57</sup>. In pazienti con timoma, l'incidenza dell'ipogammaglobulinemia

oscilla tra il 6 % e l'11%<sup>50,51</sup>. Le cause e la patogenesi di questa sindrome non sono ancora note, anche se ci sono alcune evidenze che supportano l'ipotesi che il difetto principale possa essere nel midollo osseo (arresto dello sviluppo delle cellule pre-B, alterata maturazione dei precursori linfoidi).

La patologia insorge generalmente in un'età compresa tra la quarta e la quinta decade, con una frequenza simile tra maschi e femmine. La sindrome di Good può presentarsi anche nei bambini, anche se è un evento piuttosto raro<sup>74</sup>. L'immunodeficit può precedere o seguire la diagnosi di timoma<sup>75,76</sup>. La diagnosi iniziale, come per il timoma, può derivare dall'osservazione di una massa nel mediastino anteriore, che può essere asintomatica o essere accompagnata da tosse, dolore al petto, disfagia, dispnea<sup>77</sup>.

Tra le infezioni cui vanno incontro i pazienti con sindrome di Good, le più comuni sono quelle polmonari da batteri capsulati<sup>75</sup>. Il quadro clinico osservato è simile a quello riscontrato in pazienti con immunodeficienza comune variabile (CVID, common variable immune deficiency)<sup>78</sup>. I pazienti inoltre possono presentare infezioni del tratto genito-urinario e della pelle<sup>75</sup>. Contrariamente a quanto accade nella CVID, non solo l'immunità umorale è compromessa, ma anche quella cellulo-mediata, come dimostra l'insorgenza di infezioni da citomegalovirus<sup>76</sup>. Sono state descritte anche infezioni da herpes simplex<sup>79</sup>, varicella zoster<sup>74</sup>, e polmonite da *Pneumocystis carinii*<sup>50</sup>.

Nei pazienti con sindrome di Good, come nei pazienti con timoma, si può riscontrare la presenza di patologie autoimmuni (*myasthenia gravis*, aplasia eritroide, anemia perniziosa, diabete mellito, e trombocitopenia idiopatica)<sup>73</sup>.

I patogeni più comunemente ritrovati in pazienti con sindrome di

Good sono batteri capsulati, come *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas* spp, *Klebsiella* spp<sup>75</sup>. Le infezioni micotiche sistemiche invece non sono caratteristiche di questa patologia. Per quanto riguarda le infezioni virali, il patogeno più comunemente ritrovato è il CMV.

La principale alterazione a livello del sistema immunitario è l'ipogammaglobulinemia: quasi tutti i pazienti hanno livelli ridotti di IgG, IgA e IgM sieriche<sup>80</sup>. Non ci sono però in letteratura dati sulla riduzione di anticorpi specifici verso antigeni di richiamo. Come nel timoma, anche nella sindrome di Good si riscontra l'inversione del rapporto CD4/ CD8<sup>78</sup>. Studi sull'immunità cellulo-mediata, quali l'anergia cutanea a due o più antigeni di prova, o il rigetto ritardato di trapianti di pelle, hanno sottolineato come nella sindrome di Good siano presenti anche deficit delle cellule T<sup>81, 82, 83, 84</sup>. L'analisi dell'immunità cellulare in pazienti con sindrome di Good ha rivelato che le infezioni opportunistiche, come quelle da CMV, possono essere riscontrate anche in pazienti con una conta linfocitaria superiore a quella osservata in pazienti con infezione da HIV<sup>75, 88</sup>. Inoltre, casi clinici in letteratura mostrano come pazienti con sindrome di Good e infezione da CMV abbiano perso completamente la capacità di rispondere agli antigeni virali, pur conservando la capacità di rispondere ai mitogeni policlonali come la fitoemoagglutinina (PHA)<sup>89,90</sup>.

La prognosi in pazienti con sindrome di Good è peggiore rispetto a quella di pazienti con CVID. La sopravvivenza a 5 anni dalla prima diagnosi di ipogammaglobulinemia è del 70% verso il 100% dei pazienti con CVID, e a 10 anni è del 33% rispetto al 5% dei soggetti con CVID<sup>85</sup>. Le cause principali di morte sono le infezioni<sup>58</sup>, le patologie autoimmuni, o le complicazioni ematologiche. Il timoma stesso, che in ogni caso viene rimosso chirurgicamente, non sembra peggiorare la prognosi<sup>78</sup>.

## **Pazienti, materiali e metodi.**

### *Pazienti.*

I campioni di sangue periferico e di midollo osseo, quando disponibile, sono stati raccolti in provette da emocromo con citrato di sodio come anticoagulante. Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso ad essere inseriti nello studio. Non tutti pazienti sono stati inseriti in tutte le analisi; il numero di pazienti per ogni tipo di studio è indicato nella didascalia della figura. I clinici dei pazienti sono riassunti nelle tabelle 1 e 4. L'istologia dei timomi è stata valutata secondo la classificazione dell'OMS (ref. 46), e la stadiazione del tumore secondo il criterio di Masaoka (ref. 60). I pazienti con una grave linfopenia (meno di 700 linfociti/mm<sup>3</sup>) sono stati esclusi dallo studio. Al momento del prelievo, i pazienti non erano in trattamento con farmaci immunosoppressivi. I pazienti sono stati considerati B linfopenici se la conta dei linfociti B CD19<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> era inferiore a 100, o la percentuale era inferiore al 6%. Campioni di sangue di soggetti sani, comparabili ai pazienti per sesso ed età, sono stati usati come controllo. Campioni di sangue di pazienti con immunodeficienza comune variabile (CVI) sono stati usati come controllo di patologia non correlata per l'analisi delle alterazione nei linfociti circolanti. Campioni di midollo osseo di pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico, Mielodisplasia e Istiocitosi sono stati analizzati come controllo di patologia non correlata per l'analisi di Spectratyping nel midollo osseo.

### *Analisi delle Immunoglobuline sieriche.*

Da campioni di sangue raccolti in provette senza anticoagulante è stato separato il siero mediante centrifugazione a 2000xg per 15 minuti in una centrifuga da banco Allegra X-12R (Beckman Coulter, rotore SX 4750). I livelli di IgA, IgG e IgM sono stati misurati con un protocollo classico di nefelometria (Beckman Immunochemistry System; IgM, IgG and IgA test, Beckman Coulter, Milano, Italia).

### *Separazione dei linfociti del sangue periferico e del midollo osseo.*

I linfociti sono stati separati dal sangue periferico e midollare mediante centrifugazione a 1000xg per 25 minuti, senza freno, su gradiente di Ficoll (Lymphoprep, densità 1.077 g/ml, Sentinel Diagnostic, Milano Italia) Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) così ottenute sono state quindi lavate 2 volte con PBS 1X a 750xg per 5 minuti per allontanare il Ficoll e centrifugate ulteriormente a 150xg per 15 minuti per allontanare le piastrine. I linfociti CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> (prevalentemente CD4) sono stati isolati con tecniche immunomagnetiche, utilizzando sfere magnetiche coniugate con un anticorpo anti CD8 (Dynabeads CD8, Dynal, Oslo, Norvegia) secondo i protocolli consigliati per la deplezione.

### *Citofluorimetria e sorting.*

Le analisi dell'immunofenotipo delle cellule del sangue periferico e del midollo osseo dei pazienti sono state effettuate utilizzando il citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson, Milano, Italia), con il software CellQuest (Becton Dickinson). Per l'analisi citofluorimetrica a 3 o 4 colori, il sangue intero è stato incubato con



pannelli di anticorpi monoclonali diretti verso gli antigeni di superficie. Dopo l'incubazione, gli eritrociti sono stati lisati utilizzando la FACS lysing solution (Becton Dickinson), secondo le istruzioni del produttore. I pannelli di anticorpi includono anti-CD3 (clone UCHT1), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD8 (RPA-T8), anti CD16 (3G8), anti CD19 (HIB19), anti CD56 (B159), anti CD45 (HI30) anti-CD45RA (HI100) anti-CD10 (HI10a), anti-CD34 (581), tutti dalla Becton Dickinson (Milano, Italia). L'analisi citofluorimetrica a 6 colori è stata effettuata su un citofluorimetro FACScanto (Becton Dickinson). I dati sono stati compensati ed analizzati utilizzando il software FlowJo (TreeStar, USA). I PBMC sono stati separati dal sangue periferico come descritto in "Separazione dei linfociti del sangue periferico".  $1 \times 10^6$  cellule sono state utilizzate per ogni colorazione. Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono: CD27 (O323), CD62L (DREG-56) dalla E-bioscience (San Diego, CA, USA), CD28 (CD28.2), CD8 (RPA-T8), CD45RA PE (HI100) dalla Becton Dickinson, CD3 (UCHT1) dalla Beckman Coulter. Per la separazione dei linfociti T CD8+ *naive* ed effettori le cellule sono state separate ad alta velocità (>30.000 cellule/sec) in un citofluorimetro MoFlo (DakoCytomation, Milano, Italia).

#### *Estrazione dell'RNA e Spectratyping.*

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti CD8+ e CD8- , separati magneticamente, utilizzando il TRIZOL (Invitrogen, Milano, Italia), secondo le istruzioni del produttore. In breve, le cellule sono state centrifugate a 750xg e sul risospeso in TRIZOL e cloroformio. Dopo una centrifugazione a 12000xg la soluzione si separa in una fase

organica e una fase acquosa, che contiene l'RNA. Questa fase viene raccolta in una provetta nuova e l'RNA viene precipitato utilizzando isopropanolo freddo. L'RNA viene quindi lavato in etanolo al 75% e risospeso in H<sub>2</sub>O trattata con DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma, Milano, Italia) per inattivare le RNAsi.

L'RNA dai linfociti naive (CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) ed effettori (CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) è stato estratto con il kit RNeasy 4 PCR (Ambion, Huntingdon, UK) per estrazioni di RNA da basso numero di cellule (da 1000 a 1\*10<sup>6</sup> cellule). Il kit prevede l'utilizzo di una soluzione di lisi, il caricamento del lisato su una colonna che trattiene in maniera specifica l'RNA e la sua successiva eluizione. L'RNA è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop-1000 (Celbio, Milano, Italia).

Per l'analisi di Spectratyping, 500ng di RNA totale sono stati retrotrascritti e amplificati in un'unica reazione utilizzando il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Milano, Italia). In breve, gli stessi oligonucleotidi sono stati utilizzati sia per la retrotrascrizione che per l'amplificazione. Un *primer* 3' comune è (CB3) è stato usato con 24 diversi *primer* 5' (TCRBV *primer*), le cui sequenze corrispondono a quelle indicate da J. Gorski<sup>94</sup>. Le famiglie geniche BV amplificate per i linfociti separati del midollo osseo sono: BV1, BV2, BV3, BV4, BV5.1, BV5.3, BV6.1, BV6.2, BV7, BV8, BV9, BV12, BV13, BV14, BV15, BV17, BV22 e BV24. Le famiglie amplificate per i linfociti sortati dal sangue periferico sono BV1, BV2, BV3, BV4, BV5.1, BV5.3, BV6.1, BV6.2, BV7, BV8, BV9, BV 11, BV12, BV13, BV14, BV15, BV16, BV17, BV18, BV19, BV20, BV21, BV23 e BV24. Le condizioni della reazione di retrotrascrizione ed amplificazione sono

le seguenti: 45°C per 30 min; 94°C per 30s (denaturazione), 55°C per 30s (*annealing*), 72°C per 30s (elongazione) per 35 cicli; 10 min a 72°C per l'elongazione finale. I prodotti della reazione sono stati separati sul sequenziatore automatico CEQ 8000 (Beckman Coulter, Milano, Italia). I risultati sono stati analizzati con il software CEQ 8000 (Beckman Coulter). Le famiglie geniche sono state considerate normali se presentano 5 o più riarrangiamenti distribuiti in maniera gaussiana, alterate se presentano più di tre riarrangiamenti con un profilo non gaussiano, e oligo-monoclonali se presentano 1 o 2 riarrangiamenti.

#### *Isolamento e test di funzionalità dei linfociti Treg.*

I linfociti Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> sono stati isolati con il Dynal CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg kit (Dynal, Oslo, Norvegia), secondo le istruzioni del produttore. I PBMC, isolati come descritto in “Separazione dei linfociti del sangue periferico”, sono stati incubati con una miscela di sfere magnetiche coniugate ad anticorpi diretti contro CD14, CD19, CD56, CD8 e CD235a (glicoforina), per la selezione negativa dei linfociti CD4<sup>+</sup>. Dopo separazione magnetica, i linfociti non legati alle sfere sono stati incubati con delle sfere magnetiche coniugate all'anticorpo anti CD25, per la selezione positiva dei linfociti T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Dopo l'incubazione e la separazione dei linfociti non legati alle sfere, le cellule ottenute sono state trattate con il DETACHaBEAD, una soluzione di anticorpi necessaria alla rimozione delle sfere dalle cellule. Le cellule CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (*responder*) e le CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Treg) sono state risospese in RPMI 1640 (Invitrogen, Milano, Italia), supplementato con il 10% di FCS, 2mM L-Glutamina, 0,1mM aminoacidi non essenziali, 20U/ml

pennicillina, 20µg/ml streptomicina, 1mM sodio piruvato (tutti forniti da Invitrogen), e seminate in piastre da 96 pozzeti, fondo piatto, in diversi rapporti (Treg:responder 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000). La proliferazione è stata indotta utilizzando delle sfere magnetiche coniugate con anti CD3 e anti CD28 (Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander, Dynal,  $4 \cdot 10^4$  sfere/ $1 \cdot 10^5$  cellule *responder*). Il controllo positivo è dato dall'incubazione delle cellule *responder* con le biglie anti CD3/CD28. Le cellule sono state incubate per 96 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, e nelle ultime 18 ore di incubazione è stata aggiunta la [<sup>3</sup>H]Timidina, (50µCi/ml) (Amersham International, Amersham, Buckinghamshire). Per valutare l'incorporazione nel DNA di <sup>3</sup>H-timidina, le cellule sono state processate automaticamente con un *cell harvester* (Tomtec) ed il DNA depositato su filtri. La radioattività è stata misurata mediante un contatore di radiazioni beta, *β-counter* (Microbeta Trilux – Wallac). La funzionalità dei linfociti Treg è stata misurata come capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti *responder*.

#### *Analisi statistiche.*

Tutti i test statistici sono stati effettuati tramite il programma StatView (Abacus Concepts, v1.03). I test utilizzati sono l'analisi di regressione, il test T di Student e il Mann-Whitney U test per analisi non parametriche. I risultati sono stati considerati significativi se  $p < 0,05$ .

## Risultati

### *Alterazione della linfopoiesi B in corso di Timoma.*

Nella prima parte dello studio sono stati reclutati 18 pazienti, i cui dati clinici sono riassunti nella tabella 1. Dei 18 pazienti analizzati, 6 erano soggetti ad infezioni ricorrenti a carico dell'apparato respiratorio. La tabella 2 mostra l'analisi microbiologica dell'espettorato di tre pazienti con infezioni ricorrenti. L'analisi delle immunoglobuline sieriche (IgA, IgG e IgM), riassunta nella tabella 3, ha evidenziato che solo 3 dei sei pazienti con infezioni ricorrenti avevano valori di IgG sieriche al di sotto dei limiti inferiori, ed erano quindi considerati pazienti con Sindrome di Good (ipogammaglobulinemia associata a Timoma), mentre in 5 pazienti su 6 si osserva una drastica diminuzione dei linfociti B CD19+, sia in termini percentuali (meno del 6% dei linfociti circolanti, valori di riferimento 7-15%) sia nel numero assoluto (meno di 100cellule/mm<sup>3</sup>). L'analisi statistica tra i due gruppi di pazienti dimostra che esiste un'associazione tra l'insorgenza di infezioni ricorrenti e la diminuzione di linfociti B circolanti ([figura 3](#)), ma non con l'ipogammaglobulinemia. La B-linfopenia non porta necessariamente alla riduzione dei livelli sierici di IgG ([figura 4](#)), che sono mantenute a livelli normali grazie alla secrezione da parte delle plasmacellule residenti nei tessuti linfoidi secondari. E' clinicamente evidente che, in questi casi, la presenza di queste immunoglobuline sieriche non garantisce una sufficiente protezione. Questi risultati documentano che l'incapacità a rispondere alle infezioni ricorrenti, in pazienti con Timoma, correla con la diminuzione dei linfociti B

circolanti ( $p=0,03$ ). La sindrome di Good, intesa come immunodeficienza associata a Timoma, dovrebbe quindi essere definita come B-linfopenia, piuttosto che ipogammaglobulinemia, associata a Timoma.

Per definire la natura della B-linfopenia, è stata analizzata l'espressione delle molecole CD10 e CD19 sui linfociti del midollo osseo di quattro pazienti con Timoma, di cui tre B-linfopenici. La molecola CD10 identifica i precursori dei linfociti B, mentre CD19 è un marcatore delle cellule B mature circolanti. Le cellule CD10+ CD19+ sono precursori dei B in procinto di lasciare il midollo, sede della B-linfopoiesi. La [figura 5](#) mostra come nei tre pazienti B-linfopenici manchino completamente i precursori dei linfociti B (CD10+ CD19-). In un solo paziente è presente la popolazione CD10+ CD19+, che però sembra incapace di maturare completamente e lasciare il midollo, perchè all'epoca dell'analisi le cellule B mature in periferia erano completamente assenti. Il paziente non B-linfopenico mostra una distribuzione delle popolazioni CD10+ CD19- e CD10+ CD19+ differente rispetto a quella del controllo: le cellule CD10+ CD19+, oltre ad essere aumentate in percentuale rispetto all'individuo sano, mostrano un'eterogeneità nell'intensità dell'espressione di CD10.

#### *Alterazione delle sottopopolazioni T in corso di timoma.*

Allo scopo di valutare l'impatto dei tumori timici sul compartimento cellulare T sono state effettuate analisi fenotipiche e funzionali sui linfociti circolanti nel sangue periferico di 40 pazienti con timoma di cui 20 con Sindrome di Good. I dati clinici dei pazienti inseriti in questa seconda parte dello studio sono riassunti nella tabella

4. Tutti i pazienti analizzati sono stati timectomizzati per la rimozione del tumore. La definizione di Sindrome di Good è stata fatta sulla base del numero di linfociti B circolanti (meno di  $100 \text{ cellule/mm}^3$ ). La tabella riporta i dati sulla contemporanea presenza di patologie autoimmuni. Non ci sono differenze nell'insorgenza di autoimmunità tra i pazienti con Timoma e quelli con sindrome di Good, mentre i pazienti con sindrome di Good sono più sensibili all'insorgenza di infezioni ricorrenti rispetto ai pazienti con Timoma. La tabella 5 mostra i risultati dell'analisi citofluorimetrica delle popolazioni linfocitarie circolanti nel sangue periferico dei due gruppi di pazienti e nel gruppo di controlli sani. Dallo studio sono stati esclusi i pazienti gravemente linfopenici (numero di linfociti totali inferiore a  $800/\text{mm}^3$ ) Nei due gruppi di pazienti si riscontra l'inversione del rapporto tra linfociti T CD4+ e CD8+, ma soltanto nel gruppo di pazienti con sindrome di Good si osserva una drastica riduzione del numero assoluto dei linfociti T CD4+ ([figura 6](#)). La [figura 7](#) mostra l'analisi della correlazione tra numero assoluto di linfociti B CD19+ e numero assoluto di linfociti T CD4+. Da notare che dei 15 pazienti con sindrome di Good considerati, 10 hanno un numero di linfociti T CD4+ inferiore a  $600/\text{mm}^3$ , e di questi 5 hanno una conta di cellule T CD4+ inferiore a  $400/\text{mm}^3$ .

L'inversione del rapporto CD4/CD8 osservata nei pazienti con timoma non è dovuta esclusivamente alla diminuzione dei linfociti CD4, ma anche ad un aumento del numero assoluto dei linfociti CD8 ([figura 6](#)). Sono stati quindi analizzati altri marcatori dei linfociti CD8, in particolare molecole associate a diversi stadi differenziativi delle cellule T, come CD45 RA e CD45 RO. Nei pazienti con sindrome di Good si osserva un aumento significativo della

percentuale di linfociti T CD8+ CD45RA+ rispetto a pazienti con timoma e al gruppo di controllo ( $p= 0,0008$  [figura 8A](#)). La stessa analisi è stata condotta su un gruppo di pazienti con Immunodeficienza Comune Variabile (CVI, Common Variable Immunodeficiency). Questi pazienti, come gli individui con sindrome di Good, hanno una forte diminuzione dei livelli di immunoglobuline sieriche, ma non tutti sono B-linfopenici. Nei soggetti con CVI, indipendentemente dalla conta dei linfociti B, non si osserva un aumento dei linfociti T CD8+ CD45RA+ rispetto ai controlli sani ([figura 8B](#)). Quest'evidenza indica che l'alterazione del *subset* CD8 CD45RA è caratteristica dei pazienti con sindrome di Good. Esiste una correlazione inversa tra la diminuzione della percentuale di linfociti B circolanti e l'aumento dei linfociti T CD8+ CD45RA+ ( $r=0,6$ ,  $p=0,035$ , [figura 9](#)). Il 68% dei pazienti con sindrome di Good ha una percentuale di cellule CD8+ CD45RA+ superiore al 25%, mentre solo il 4% (1 paziente su 21) di quelli con timoma supera questo valore. La molecola CD45RA identifica le cellule T *naive*, cioè recentemente migrate dal timo in periferia. La funzionalità timica diminuisce con l'età, e questo si evidenzia con un decremento della percentuale di linfociti T naive. Tuttavia, in pazienti con sindrome di Good la percentuale di linfociti T CD8+ CD45RA+ rimane alta anche negli individui più anziani, contrariamente a quanto si osserva in pazienti con timoma e nei soggetti sani (dati non mostrati).

L'analisi citofluorimetrica a 6 colori ha consentito di definire meglio la natura delle cellule CD8+ CD45RA+ che aumentano nei pazienti con timoma. Tra le cellule T CD8+ CD45RA+ sono naive soltanto quelle che esprimono anche CD62L, CD27 e CD28, mentre le CD45RA CD62L- CD27- sono le cellule effettrici (l'espressione di



CD27 viene ridotta in seguito a attivazione dei linfociti). La [figura 10](#) illustra l'analisi condotta su due pazienti rappresentativi, uno con timoma (pannello superiore) e uno con sindrome di Good (pannello inferiore). Tra i due pazienti è evidente la differenza nella composizione del subset CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>: mentre nel paziente con timoma c'è un'espansione delle cellule effettrici, nel paziente con sindrome di Good si riconferma l'accumulo di linfociti T CD8<sup>+</sup> naive. La [figura 11](#) riassume i risultati di quest'analisi su tre pazienti con timoma e tre pazienti con sindrome di Good (con la percentuale di linfociti B inferiore all'1%). Ogni grafico a torta rappresenta il subset CD8, e ogni spicchio indica la percentuale delle diverse sottopopolazioni analizzate per l'espressione di CD45RA e CD62L. Il grafico a barre indica il contributo delle due popolazioni CD27<sup>+</sup> e CD27<sup>-</sup> al totale dei linfociti CD8 naive: in questo subset di linfociti, il rapporto tra cellule CD27<sup>+</sup> e CD27<sup>-</sup> è sostanzialmente mantenuto e paragonabile a quello dei controlli sani. L'alterazione principale quindi è l'aumento dei linfociti T naive nei pazienti con Sindrome di Good a discapito degli effettrici.

#### *Analisi del repertorio clonale T in corso di timoma.*

L'accumulo di linfociti naive osservato nei soggetti con Sindrome di Good potrebbe dipendere da un'espansione monoclonale, suggestiva di un linfoma, o da una generazione extratimica di linfociti maturi. Per chiarire questo aspetto è stata valutata la complessità del repertorio del TCR nei linfociti *naive* ed effettrici, separati tramite *cell sorter*. A questo scopo, è stata analizzata l'espressione delle famiglie

dei geni per la regione variabile della catena beta del recettore per l'antigene dei linfociti T (TCR) tramite Spectratyping. La [figura 12](#) mostra lo stato del repertorio TCR espresso dai linfociti T CD8+ naive (pannello superiore) ed effettori (pannello inferiore) di un paziente con sindrome di Good. Al momento della determinazione, il paziente aveva la percentuale di linfociti B CD19+ circolanti inferiore all'1%. Una famiglia V $\beta$  è definita normale se presenta 5 o più riarrangiamenti (evidenziati come picchi, la cui area è proporzionale all'intensità di espressione del gene) con una distribuzione gaussiana attorno al segmento genico di lunghezza mediana. Si definiscono alterate le famiglie che non rispondono a questi requisiti, e oligomonoclonali se presentano uno o due picchi (riarrangiamenti). Il repertorio espresso dai linfociti *naive* CD45RA+ CD62L+ CD27+ è sostanzialmente mantenuto: tutte le famiglie sono espresse con intensità paragonabile (dati non mostrati), e esprimono tutti i riarrangiamenti con un andamento gaussiano. Le cellule CD45RA+ CD62L- CD27- hanno un profilo alterato, compatibile con la loro attività effettrice. Complessivamente, il repertorio naive nei pazienti con sindrome di Good è più conservato rispetto a quello osservato nei pazienti con timoma ([figura 13A](#)): la maggior parte (60%) delle famiglie espresse è normale, e non ci sono picchi oligomonoclonali, che si ritrovano invece in alcuni pazienti con timoma. Sia i pazienti con timoma che quelli con sindrome di Good hanno invece il repertorio espresso dagli effettori profondamente alterato, con molte famiglie V $\beta$  che esprimono solo uno o due riarrangiamenti. L'analisi riportata in [figura 13B](#) in che percentuale di pazienti le singole famiglie V $\beta$  si ritrovano alterate o mono-oligoclonali. Da notare che la

famiglia BV18 ha un profilo mono-oligo clonale sia nei pazienti con timoma che in quelli con sindrome di Good, mentre prevalentemente in questi ultimi si ritrova un'alterazione oligo-monoclonale delle famiglie BV2 e BV3.

Per investigare ulteriormente la patogenesi della B-linfopenia, è stato analizzato il repertorio delle cellule T CD4 e CD8 nel sangue periferico e nel midollo osseo, sede della B-linfopoiesi. La popolazione CD4 mantiene un repertorio sostanzialmente conservato (dati non mostrati) sia nel sangue periferico che nel midollo dei due gruppi di pazienti. Il subset CD8, invece, presenta un'alterazione oligo-monoclonale della famiglia BV8 che si ritrova soltanto nel midollo osseo dei pazienti con sindrome di Good ([figura 14A](#)). La famiglia BV8 è normale nel sangue periferico di questi pazienti, e nel midollo di pazienti con timoma, o con altre patologie non correlate al timoma (mielodisplasia, istiocitosi, LES). Non si ritrovano altre espansioni mono-oligoclonali comuni a più pazienti ([figura 14B](#)). Questi risultati suggeriscono la presenza di un antigene nel midollo osseo verso cui rispondono i linfociti T CD8+ BV8+, determinando uno stato infiammatorio potenzialmente coinvolto nel blocco della linfopoiesi B.

#### *Alterazione dei sistemi di tolleranza periferica in corso di timoma.*

Lo studio sugli effetti del timoma sulle cellule T è stato esteso alle cellule con funzione soppressoria che co-esprimono i marcatori CD4 CD25 definite cellule T regolatorie (Treg). Questi linfociti sono in grado di limitare la risposta immunitaria e sono probabilmente coinvolti nei meccanismi di tolleranza periferica. L'analisi

citofluorimetrica ha evidenziato una riduzione della percentuale ( $p < 0,000001$ , [figura 15A](#)) e nel numero assoluto ( $p < 0,000001$ , [figura 15B](#)) di linfociti Treg CD4+ CD25+ in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai controlli sani. Non ci sono differenze significative tra i pazienti con Timoma e quelli con sindrome di Good. La diminuzione dei linfociti Treg potrebbe essere dovuta alla riduzione globale del *subset* CD4+; per verificare quest'ipotesi, le percentuali di linfociti CD4+ CD25+ circolanti sono state normalizzate per le percentuali di cellule T CD4+ totali. Nei controlli sani le Treg rappresentano il 19,7% dei linfociti CD4+ ([figura 15C](#)), mentre nei pazienti con sindrome di Good e in quelli con timoma sono rispettivamente l'11,7% e il 13,5% ( $p = 0,03$ ). Quest'evidenza suggerisce che, accanto alla riduzione certamente dovuta alla diminuzione di linfociti T CD4+, ci sia anche una perdita selettiva delle cellule Treg.

La valutazione dei meccanismi cellulari, responsabili della tolleranza periferica, non può prescindere dall'analisi funzionale dei linfociti Treg CD4+ CD25+. Quest'analisi si rende necessaria poiché la molecola CD25, recettore dell'IL2 e marcatore delle Treg, è espressa anche sui linfociti attivati. L'attività regolatoria delle cellule T CD4+ CD25+ viene quindi misurata come capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti T CD4+ CD25- autologhi (*responder*) in risposta a stimoli mitogenici policlonali, come la stimolazione delle molecole CD3 e CD28. Le Treg isolate da pazienti con Timoma e con sindrome di Good sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule *responder* autologhe in maniera paragonabile a quelle dei controlli sani ([figura 16](#)). Quindi la diminuzione del numero di Treg, piuttosto che una carenza della loro capacità soppressoria, potrebbe contribuire all'instaurarsi di fenomeni autoimmuni in corso di timoma.



## **Discussione.**

### *Alterazione della linfopoiesi B in corso di Timoma.*

La sindrome di Good è definita come ipogammaglobulinemia associata a Timoma<sup>71, 73, 75</sup>. Nella prima parte dello studio, sono stati caratterizzati 18 pazienti, di cui 6 con infezioni ricorrenti. Il quadro clinico di questi pazienti, per il tipo e la frequenza di infezioni riscontrate, li avvicina a quelli con CVID<sup>73</sup>, ma a differenza di questi, non tutti i pazienti con timoma e aumentata sensibilità alle infezioni mostrano una diminuzione dei livelli sierici di immunoglobuline. L'analisi citofluorimetrica multiparametrica del sangue periferico ha permesso di identificare pazienti con timomi con grave linfopenia B, che non è sempre associata alla diminuzione dei livelli sierici di immunoglobuline. Questi pazienti non rientrano quindi nella classica definizione di GS, anche se presentano evidenti segni clinici di immunodeficienza, che è associata quindi alla severità della linfopenia B e non al deficit di anticorpi circolanti. Questi risultati ridefiniscono la sindrome di Good come B-linfopenia associata al timoma<sup>57</sup>.

L'analisi citofluorimetrica multiparametrica del midollo osseo di alcuni pazienti con timoma ha evidenziato difetti di linfopoiesi allo stadio pre-B e pro-B. In particolare, nei pazienti B linfopenici la popolazione pre B CD10+ CD19- è completamente assente, e la popolazione CD10+ CD19+ è assente o incapace di migrare in periferia. Questi risultati indicano che la B-linfopenia è secondaria ad un deficit intramidollare di linfopoiesi B, come è stato dimostrato per altre patologie ematiche associate al timoma, come l'aplasie eritroide (pure red cell aplasia)<sup>97,91,92</sup>. L'analisi del midollo dovrebbe essere sempre eseguita in pazienti con timoma, per identificare precocemente

i pazienti in fase “pre Good”: il paziente con timoma non B-linfopenico analizzato presentava una popolazione non omogenea di linfociti CD10+ CD19+ nel midollo, con una distribuzione differente rispetto al controllo sano. A distanza di un anno, il paziente ha poi sviluppato la Sindrome di Good, con la perdita totale dei linfociti B in periferia.

*Alterazione delle sottopopolazioni T in corso di timoma.*

Nei pazienti con sindrome di Good si riscontra una forte diminuzione dei linfociti T helper CD4+: questo li accomuna ai pazienti con infezioni da HIV<sup>98,99</sup>, ai quali sono simili anche per l'aumentata sensibilità alle infezioni da patogeni opportunisti<sup>78, 57</sup>. L'attività helper dei linfociti T CD4+ è necessaria alla corretta generazione di linfociti T CD8+ *memory*<sup>100,101,102</sup>. Questo potrebbe spiegare l'accumulo di linfociti T CD8+ *naive* osservato nei pazienti con sindrome di Good, anche se questa relazione non è vera nei pazienti con HIV<sup>31,103</sup>, che hanno livelli di linfociti CD4+ molto al di sotto della normalità (meno di 400 cellule/mm<sup>3</sup>), ma non si osserva un aumento del *subset* T CD8+ CD45RA+ CD62L+ CD27+. In soggetti sani, la popolazione *naive* CD8+ tende a diminuire con l'età, e ad essere sostituita dai linfociti T effettori, e dalle cellule della memoria<sup>104,105,106</sup>. La percentuale di linfociti T CD8 *naive* nei pazienti con sindrome di Good si mantiene invece molto più alta nei controlli anche nei pazienti anziani. Nei pazienti con infezioni croniche (da HIV, da CMV, da EBV), di solito si ritrova un'espansione del *subset* degli effettori, piuttosto che delle cellule *naive*, anche se i dati presenti in letteratura si riferiscono generalmente al fenotipo dei linfociti T CD8+ specifici per il virus, identificati utilizzando i tetrameri MHC

<sup>103,105</sup>. Queste osservazioni confermano come l'espansione della popolazione di linfociti T CD8+ sia un'ulteriore caratteristica specifica dei pazienti con sindrome di Good, e come la mancanza degli effettori sia correlata all'incapacità di controllare le infezioni da patogeni opportunisti come il CMV. La sindrome di Good non va definita quindi come "ipogammaglobulinemia" ma come una condizione di "immunodeficit severo combinato associato" (SCID) associata a timoma, in cui i linfociti T CD4 e CD8, e i linfociti B sono incapaci di rispondere in maniera efficace alle infezioni da patogeni batterici e virali.

All'immunodeficienza, nei pazienti con sindrome di Good, si può associare la presenza di patologie autoimmuni: la diminuzione della percentuale e del numero assoluto di linfociti Treg CD4+ CD25+ può associarsi alla slatentizzazione di cloni auto-aggressivi<sup>107-110</sup>, anche se questa condizione non è specifica per la sindrome di Good, ma è comune a tutti i pazienti con timoma<sup>95,96</sup>.

#### *Analisi molecolare del repertorio clonale T in corso di timoma.*

L'accumulo di linfociti vergini osservato nei soggetti con GS potrebbe dipendere da un'espansione monoclonale, suggestiva di un linfoma, o da una generazione extratimica di linfociti maturi. Per chiarire questo aspetto è stata valutata la complessità del repertorio del TCR nei linfociti vergini ed effettori, separati mediante citofluorimetro a flusso. La combinazione di queste tecniche ha permesso di evidenziare marcate differenze nella complessità dei repertori clonali nei soggetti B-linfopenici rispetto ai pazienti non B-linfopenici: nei soggetti con sindrome di Good, il repertorio *naive* è perfettamente conservato, come se il timo avesse ancora la



funzionalità che si osserva in un soggetto giovane: quest'osservazione suggerisce che, essendo tutti i pazienti timectomizzati, possa esistere una sede di timopoiesi extratimica, che funziona normalmente anche dopo la rimozione del timo. L'analisi degli effettori T CD8+ ha mostrato la presenza di espansioni oligo-monoclonali comuni ai pazienti con timoma e a quelli con sindrome di Good, come BV18, e di altre presenti quasi esclusivamente nei pazienti con sindrome di Good, come BV2.

Per investigare la patogenesi della B-linfopenia, è stato analizzato il repertorio delle cellule T CD4 e CD8 nel midollo osseo, sede della B-linfopoiesi. Mentre la popolazione CD4 mantiene un repertorio sostanzialmente conservato, come osservato nel sangue periferico, il midollo dei pazienti B-linfopenici è infiltrato da una popolazione oligoclonale di cellule T CD8+. Questi risultati hanno rivelato l'esistenza di una reazione immunitaria intramidollare mediata dai linfociti CD8 potenzialmente responsabile dell'eliminazione dei linfociti B autologhi, che potrebbe spiegare l'alterazione della B-linfopoiesi evidenziata dall'analisi citofluorimetrica.

### *Conclusioni*

I risultati ottenuti portano ad una nuova definizione della Sindrome di Good come Immunodeficienza Combinata Severa associata a timoma, nella quale la gravità delle infezioni si associa alla perdita progressiva e irreversibile dei linfociti T CD4, dei linfociti B e all'alterazione del programma di differenziamento dei linfociti T CD8. La B-linfopenia non si manifesta come ipogammaglobulinemia, ed è determinata da un blocco della linfopoiesi nel midollo osseo, dove i precursori delle cellule B possono essere completamente assenti o

accumulati in una forma immatura. Il blocco della linfopoiesi può essere determinato da un'autoaggressione a livello midollare, mediata da linfociti T citotossici, espansi nel midollo per la presenza di un antigene che ne guida la proliferazione. L'attivazione dei linfociti T verso un autoantigene può essere innescata dall'attivazione di un'infezione virale latente: un possibile candidato è il Citomegalovirus (CMV). Il follow-up di questi pazienti ha evidenziato inoltre come la sindrome di Good sia un'evoluzione del timoma, per cui l'analisi dell'immunofenotipo T- B dovrebbe essere effettuata anche in pazienti che non siano clinicamente immunocompromessi.

I risultati ottenuti, e il confronto con i dati presenti in letteratura su altre patologie ad etiologia nota simili alla sindrome di Good possono aiutare a definire dei modelli di patogenesi. Un'ipotesi è quella dell'alterazione genetica, a carico di geni che sintetizzano proteine preposte ai meccanismi di riarrangiamento e riparo del DNA, come accade in alcune SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*). Se quest'ipotesi è vera, la stessa alterazione genetica potrebbe innescare l'attivazione degli oncogeni e quindi la comparsa del timoma, il deficit di differenziamento dei linfociti T e la mancata produzione di immunoglobuline. Contro quest'ipotesi però, c'è la mancanza di dati solidi in letteratura riguardo alterazioni geniche comuni a più pazienti.

Un'ipotesi è che, come nell'HIV, esista un virus linfotropico, che infetti i linfociti B nel midollo, e in parte i linfociti CD4+ circolanti, riducendone progressivamente il numero. La presenza di un virus nel midollo potrebbe anche spiegare l'attivazione monoclonale dei linfociti CD8+ BV8+ osservata nel midollo dei pazienti con sindrome di Good. Il virus potrebbe essere "opportunist" e

slatentizzarsi in seguito ad uno stato di immunodeficit, o comunque di alterazione del sistema immunitario secondari al timoma o alla timectomia. In questo caso, uno dei candidati più probabili è il CMV. Quest'ipotesi è supportata dall'aumentata incidenza di infezioni cardiache, polmonari e oftalmiche da CMV in pazienti con sindrome di Good. Inoltre, nel follow up di alcuni dei pazienti considerati in questo studio, abbiamo potuto osservare che in seguito a terapie antivirali si osserva un aumento della conta di linfociti B.

*Ringrazio il prof. Luigi Racioppi, che mi ha dato fiducia sin dall'inizio, e mi ha guidato nel mio percorso formativo, trasmettendomi l'entusiasmo e la passione per la ricerca.*

*Ringrazio la dott. Anna Maria Masci, con cui ho lavorato e che è maestra e amica.*

*Ringrazio la dott.ssa Giovanna Palmieri, il lato "clinico" di questo lavoro, che è sempre stata disponibile alla collaborazione e all'interscambio tra clinica e ricerca.*

*Ringrazio il prof. Serafino Zappacosta, nel cui gruppo sono cresciuta.*

*Ringrazio tutti i colleghi e amici del laboratorio di Immunologia del prof. Zappacosta e tutti gli amici del quattordicesimo piano, con i quali ho condiviso alti e bassi e pause caffè....!*

*Ringrazio il dott. Luca Battistini, per i commenti critici sulla parte di citofluorimetria e la disponibilità alla collaborazione.*

*Ringrazio il prof. Sergio Bonini e i colleghi e amici dell'IRRCS San Raffaele, Roma, che mi hanno consigliato e supportato nella fase finale del dottorato.*

## **TABELLE E FIGURE**

**Tabella 1. Dati clinici dei pazienti con Timoma.**

Paziente	Sesso/età	Timectomia	Istotipo	Stadio	Patologie associate	Infezioni ricorrenti
1	F/75	Biopsia	C <sup>1</sup>	III <sup>2</sup>	U <sup>3</sup>	Sì
2	M/54	Timectomia	B2	IVa	MG	Sì
3	F/58	Timectomia	B1	II		Sì
4	M/56	Timectomia	B2	IVa		Sì
5	M/72	Biopsia	B1	IVa		Sì
6	M/48	Timectomia	B3	IVa		
7	F/52	Timectomia	AB	II	MG, PRCA	
8	M/61	Biopsia	B2	IVb	PRCA	Sì
9	F/70	Biopsia	C	III	My	
10	F/64	Timectomia	AB	II		
11	F/40	Timectomia	B2	II	MG	
12	M/19	Timectomia	B1	II		
13	F/68	Timectomia	C	IVb		
14	F/48	Timectomia	B3	III	MG	
15	F/64	Timectomia	C	IVb		
16	M/34	Timectomia	Liposarcoma	II		
17	M/61	Timectomia	C	III		
18	F/65	Timectomia	B2	II	MG	

<sup>1</sup> Secondo il sistema di stadiazione di Masaoka(ref1)

<sup>2</sup> Secondo la classificazione dell'OMS (ref.46)

<sup>3</sup> O, Orticaria; My, Mieloradiculopatia; MG, *Myasthenia Gravis*; PRCA, Aplasia Eritroide (Pure Red Cell Aplasia).

**Tabella 2. Analisi dell'espettorato di tre pazienti con infezioni polmonari ricorrenti.**

Paziente 2	<i>Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Staphylococcus aureus, Haemophilus parainfluenzae, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter agglomerans</i>
Paziente 5	<i>Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans</i>
Paziente 8	<i>Salmonella gruppo B, Streptococcus viridans gruppo B, Branhamella catarrhalis, Candida albicans</i>

**Tabella 3. Analisi delle immunoglobuline circolanti e dei linfociti T e B in pazienti con Timoma.**

Paziente	IgG <sup>1</sup>	IgA	IgM	CD3+ (%)	CD3+ (cellule/mm <sup>3</sup> )	CD19+ (%)	CD19+ (cellule/mm <sup>3</sup> )
1	7.4 <sup>1</sup>	2.8	1.0	70 <sup>2</sup>	1876	0 <sup>3</sup>	0
2	12.0	2.8	0.5	68	1300	3	39
3	2.3	0.2	0.1	59	1242	14	173
4	7.4	1.0	0.6	84	2017	0	0
5	2.3	0.2	0.2	98	5444	0	0
6	10.0	2.4	1.2	62	1358	12	162
7	1.8	0.3	0.2	93	2400	3	72
8	8.2	2.0	0.9	98	19629	0	0
9	1.2	0.3	0.1	83	1845	0	0
10	9.6	1.6	1.2	69	756	17	128
11	12.3	2.2	1.1	90	1349	3	44
12	7.8	1.4	1.2	68	1055	20	315
13	16.9	4.8	1.5	65	850	15	196
14	9.0	2.0	0.5	56	941	5	84
15	8.8	1.5	1.7	70	1680	5	120
16	8.6	1.2	0.8	54	128	1	2
17	13.7	2.8	1.6	76	1762	4	90
18	10.6	3.1	1.2	62	1411	7	159

Valori di riferimento: <sup>1</sup>IgG 7–16 g/l, IgA 0.7–4.1, IgM 0.4–2.3

<sup>2</sup>Linfociti T CD3+: 65–85%, 1000–1500 n/mm<sup>3</sup>,

<sup>3</sup>Linfociti B CD19+: 7–15%, 70–225 n/mm<sup>3</sup>.

**Tabella 4. Dati clinici dei pazienti con Timoma.**

Pazienti	Sesso F/M	Età (intervallo)	Stadio <sup>2</sup>	Istotipo <sup>3</sup>	Infezioni ricorrenti	Patologie associate <sup>4</sup>
(numero di casi)						
Sindrome di Good <sup>1</sup> (n=19)	6/13	47 (28-64)	I (1), II (4), III (3), IVa (9), IVb (2)	AB (3); B1 (1); B2 (7); B3 (5); C (1)	Sì (12), No (8)	MG (12), PRCA (1), SLE (1), PNH (1), psoriasi (1) vasculite (1), asma (1), tiroidite (1), liken (1).
Non B- linfopenici (n=21)	11/10	48 (19- 69)	I (3), II (10), III (1), IV (4), N.D. <sup>5</sup> (3)	AB (2), B1 (4), B2 (10), C (1), N.D. (3)	Sì (7), No (14)	MG (10), liken (2), PRCA (1), asma (1), vitiligo (1), vasculite (1), multineurite cronica (1).

<sup>1</sup>meno di 100 cellule/mm<sup>3</sup>

<sup>2</sup>Secondo il sistema di stadiazione di Masaoka(ref1)

<sup>3</sup>Secondo la classificazione dell'OMS (ref.46)

<sup>4</sup> MG, *Myasthenia Gravis*; PRCA, Aplasia Eritroide (Pure Red Cell Aplasia); SLE, Lupus Eritematoso Sistemico (Systemic Lupus Erythematosus); PNH, Emoglobinuria Parossistica Notturna (Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria).

<sup>5</sup> N. D. Non definito.

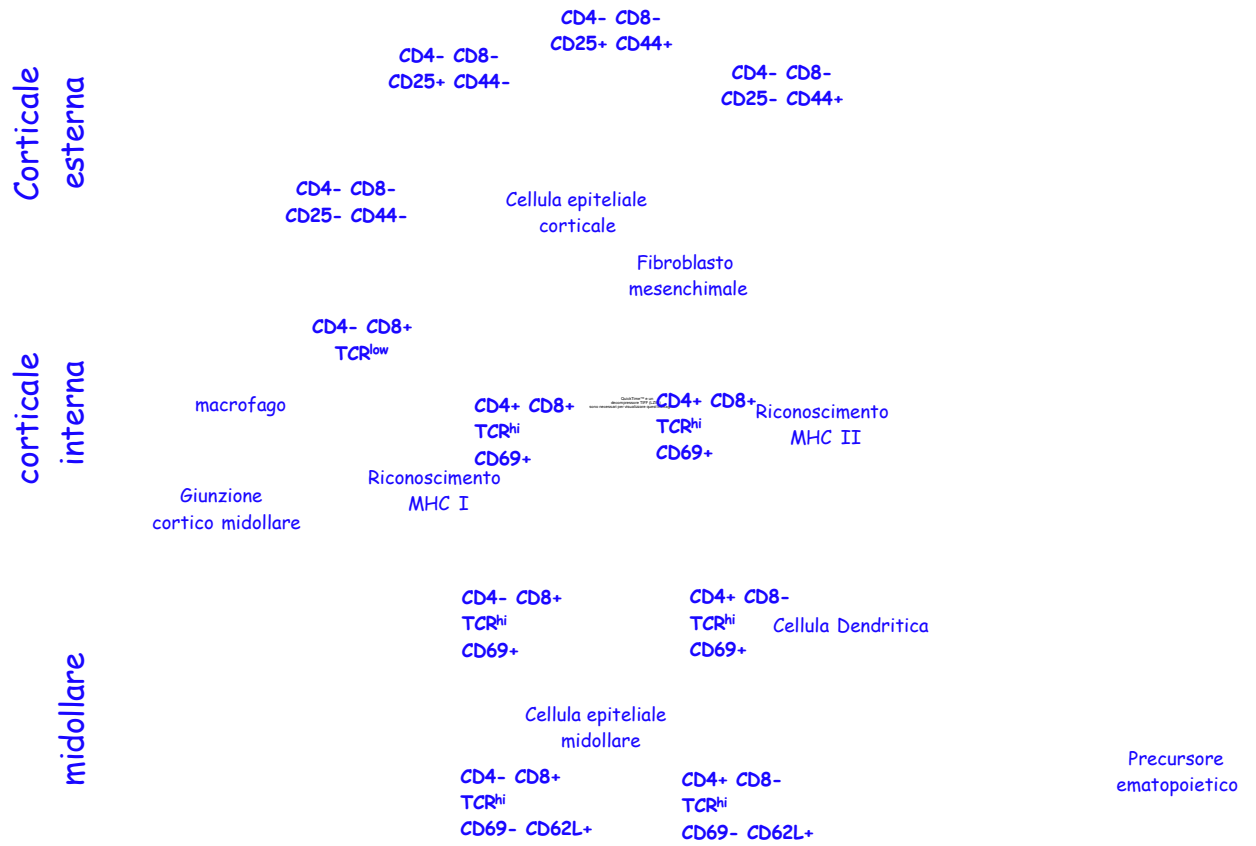


**Tabella 5. Analisi dell'immunofenotipo in pazienti con Timoma.**

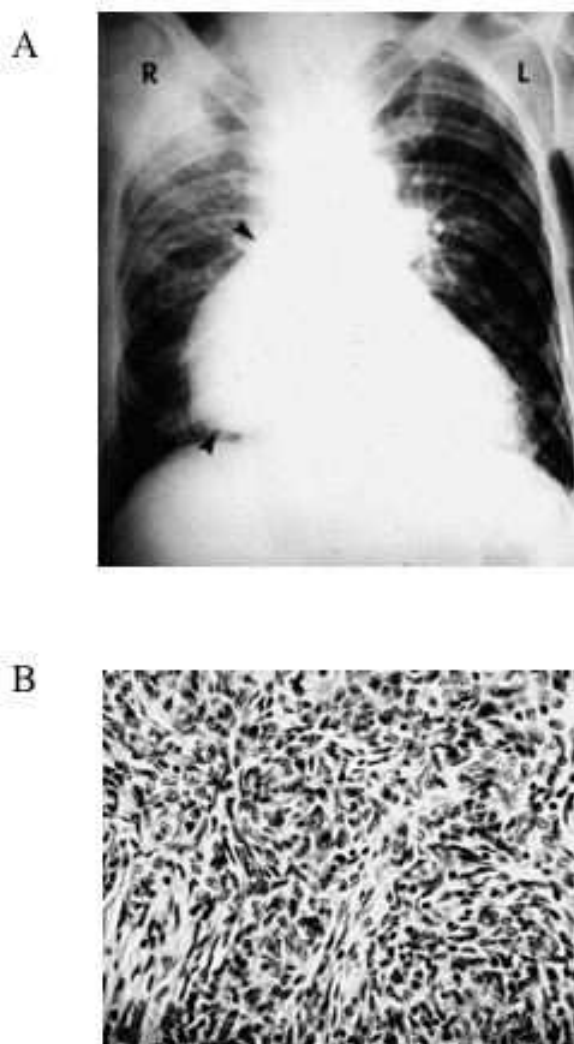
Linfociti	Sindrome di Good (n=19)	Timoma (n=21)	Controlli (n=25)
CD3+	80,7±11,0 * (1140±434) <sup>1</sup>	71,4±9,1 (1499±817)	72,8±5,2 (1366±382)
CD4+	34,8±13,6* (476±228) *	36,3±11,4* (749±464)	62,8±8,1 (843±285)
CD8+	40,2±12,9* (585±330) *	31,6±12,0 (691±555) *	30,7±7 (440±199)
CD19+	2,2±2,1* (34±30) *	12,4±5,7 (232±115)	11,8±3 (224±98)
CD16+56+	12,9±10,1 (173±145)	12,8±5,8 (257±169)	12,6±5 (231±105)

<sup>1</sup>I valori tra parentesi indicano il numero di cellule/mm<sup>3</sup>

\* Differenze statisticamente significative (p<0,005)



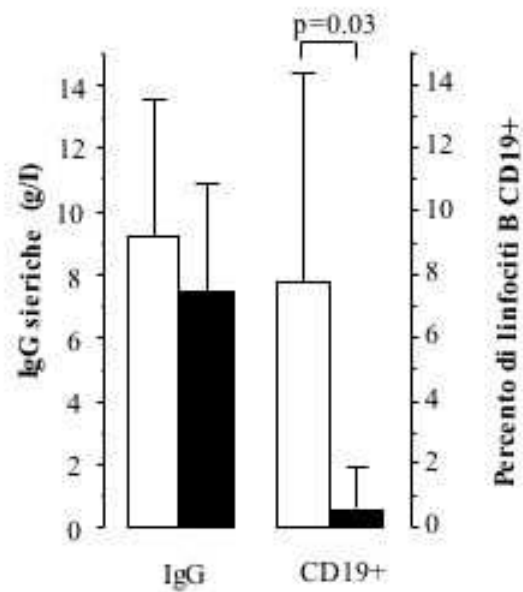
QuickTime™ e un decompressore TIFF (LZW) sono necessari per visualizzare quest'immagine.



**Figura 2. Criteri per la diagnosi di Timoma.**

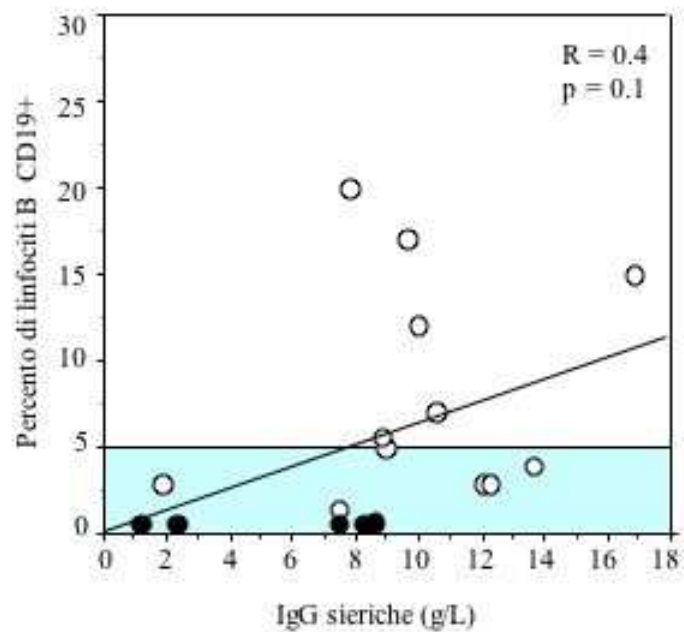
A. Radiografia postero-anteriore di un paziente con timoma. Si nota una massa che si estende verso destra.

B. Tessuto timico in un paziente con timoma e sindrome di Good. Si nota la prevalenza di cellule epiteliali fusate e la scarsità di tessuto linfoide. (da Good RA, Imm Rev 2002 ref. 71)



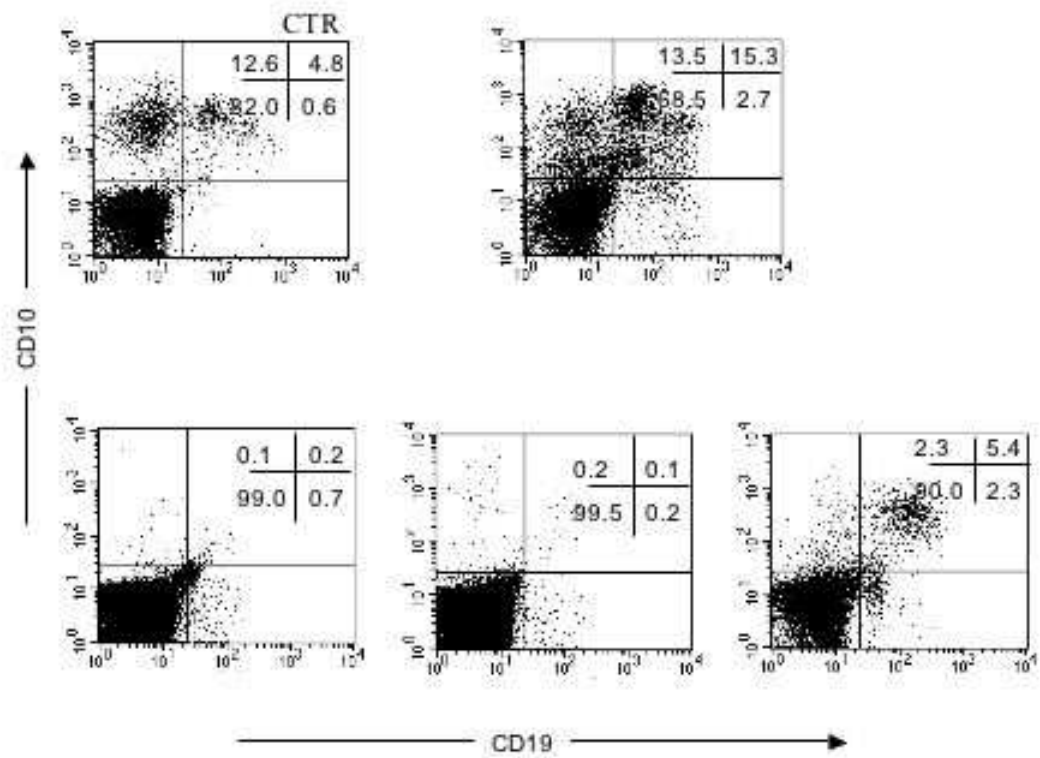
**Figura 3. Correlazione tra B-linfopenia ed insorgenza di infezioni ricorrenti in pazienti con Timoma.**

Il grafico indica le medie dei valori di IgG sieriche e linfociti B circolanti in pazienti con timoma (n=13, barra bianca) e in pazienti con timoma e infezioni ricorrenti (n=6, barra nera). La barra dell'errore indica la deviazione standard. L'analisi statistica indica una correlazione significativa ( $p=0,03$ ) tra la diminuzione della percentuale di linfociti B circolanti e l'insorgenza di infezioni ricorrenti.



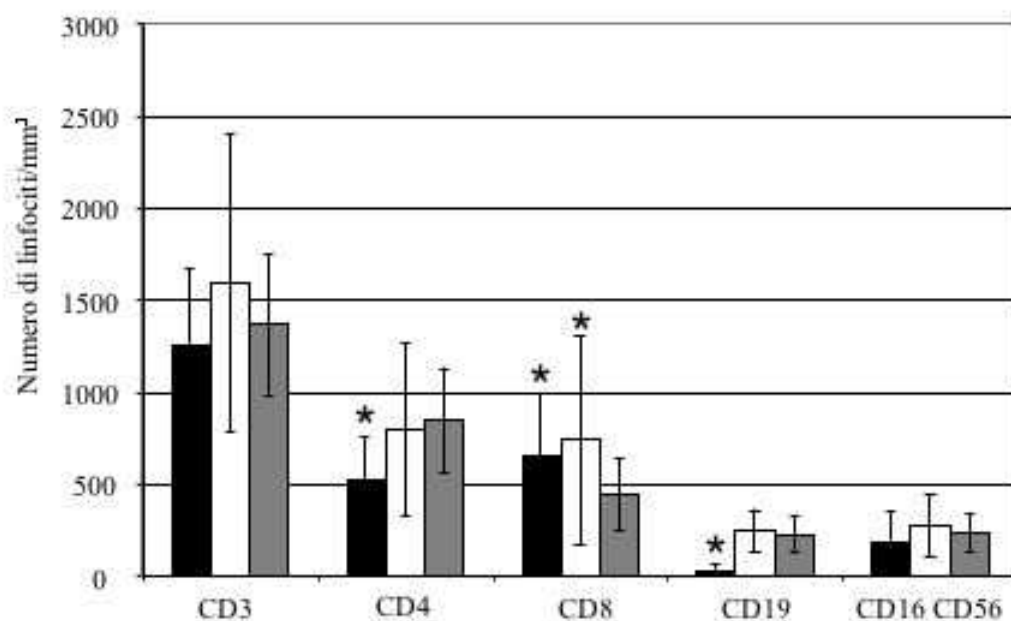
**Figura 4. Correlazione tra IgG sieriche e linfociti B circolanti.**

Il grafico mostra la distribuzione dei valori delle IgG sieriche rispetto ai linfociti B circolanti in 13 pazienti con Timoma (cicloletti bianchi) e in 6 pazienti con timoma e infezioni ricorrenti (cicloletti neri). L'analisi di regressione indica che non c'è una corrispondenza tra la diminuzione delle cellule B e l'ipogammaglobulinemia ( $r = 0,4$   $p = 0,1$ ).



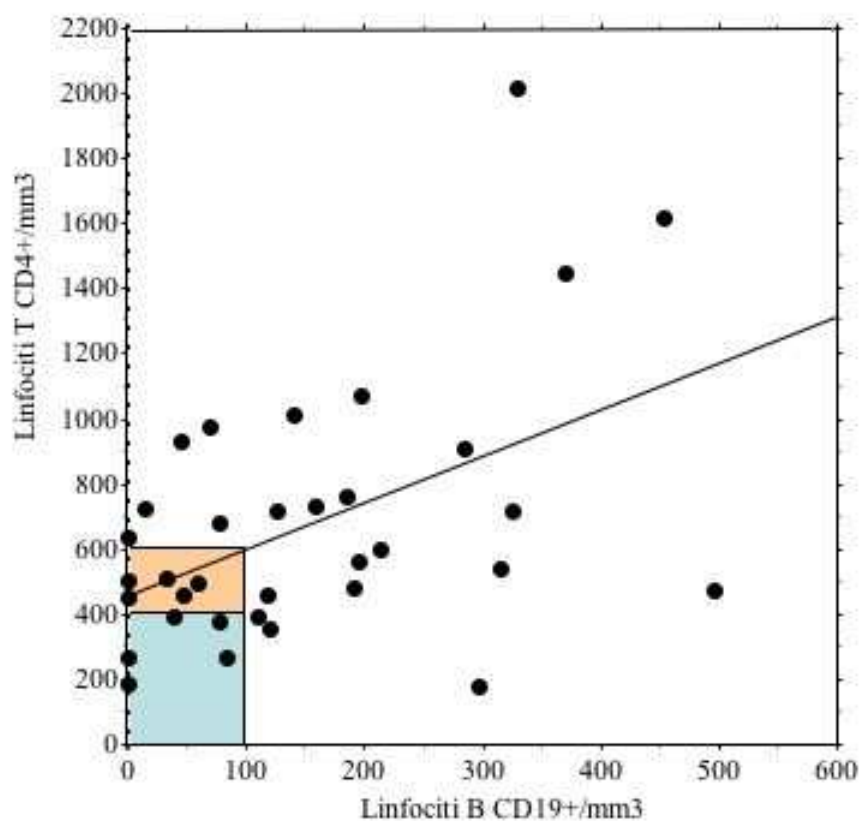
**Figura 5. Analisi citofluorimetrica dei precursori dei linfociti B in pazienti con Timoma.**

I citogrammi mostrano l'analisi dell'espressione delle molecole CD10 e CD19 sui linfociti presenti nel midollo osseo di un paziente con timoma e di un controllo (pannello superiore) e di tre pazienti B linfopenici. I numeri nei citogrammi indicano la percentuale di cellule nei quattro quadranti. Le cellule CD10+ CD19- e CD10+ CD19+ rappresentano i precursori dei linfociti B.



**Figura 6. Alterazioni nel numero dei linfociti circolanti in pazienti con Timoma e Sindrome di Good.**

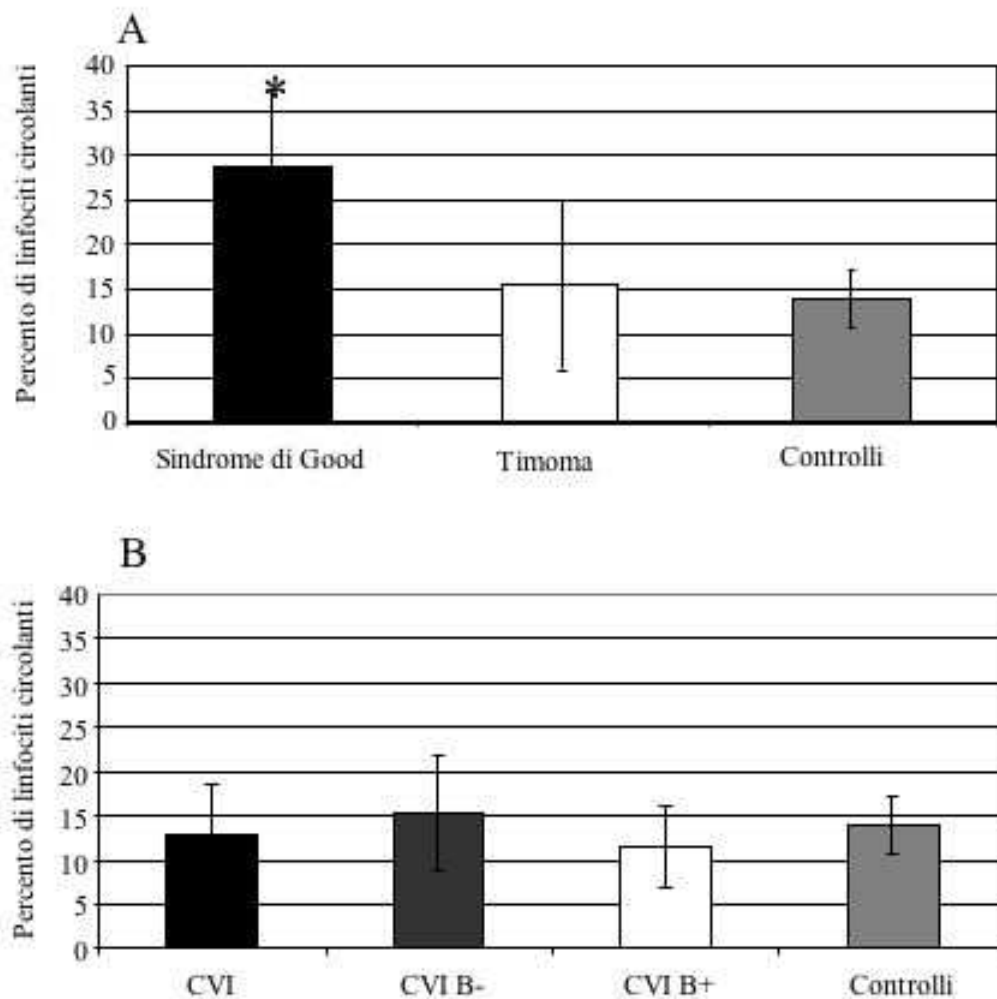
L'istogramma indica la media del numero assoluto delle diverse popolazioni di linfociti circolanti osservato in pazienti con Sindrome di Good (n=15, nero), con Timoma (n=19, bianco), e nei controlli sani (n=25, grigio). Dall'analisi sono stati esclusi i soggetti francamente linfopenici (linfociti totali < 1000/mm<sup>2</sup>). L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa (p<0,05) rispetto al controllo.



**Figura 7. Correlazione tra il numero di linfociti B CD19+ e il numero di linfociti T CD4+ in pazienti con Timoma.**

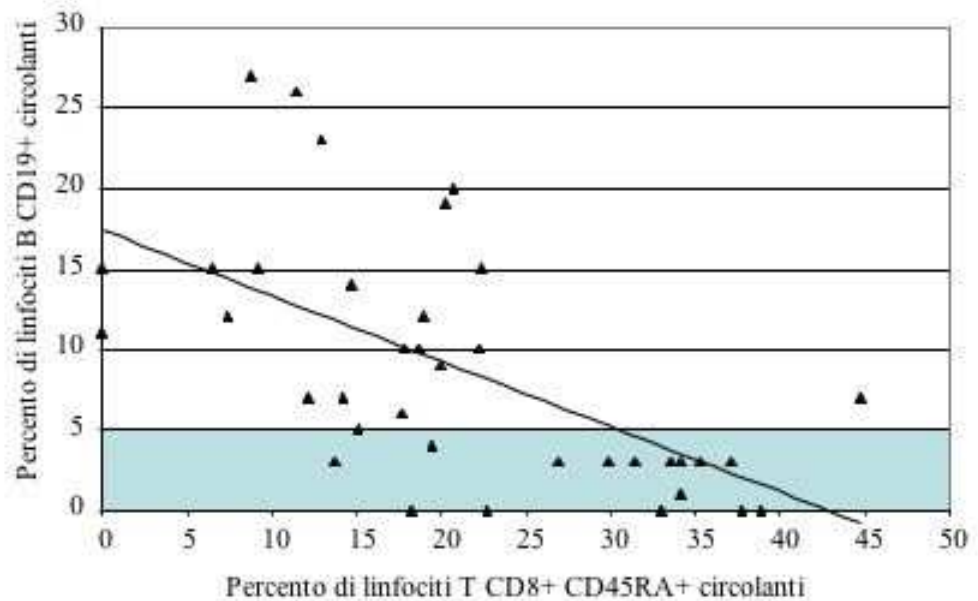
Il grafico mostra come al diminuire dei linfociti CD19+ sia associata la diminuzione di linfociti T CD4+ ( $r=0,5$ ,  $p=0,035$ ). Dei 15 pazienti con Sindrome di Good analizzati, 10 hanno meno di 600 cellule CD4+ /mm<sup>2</sup>, e di questi 5 hanno meno di 400 cellule CD4+/mm<sup>2</sup>.





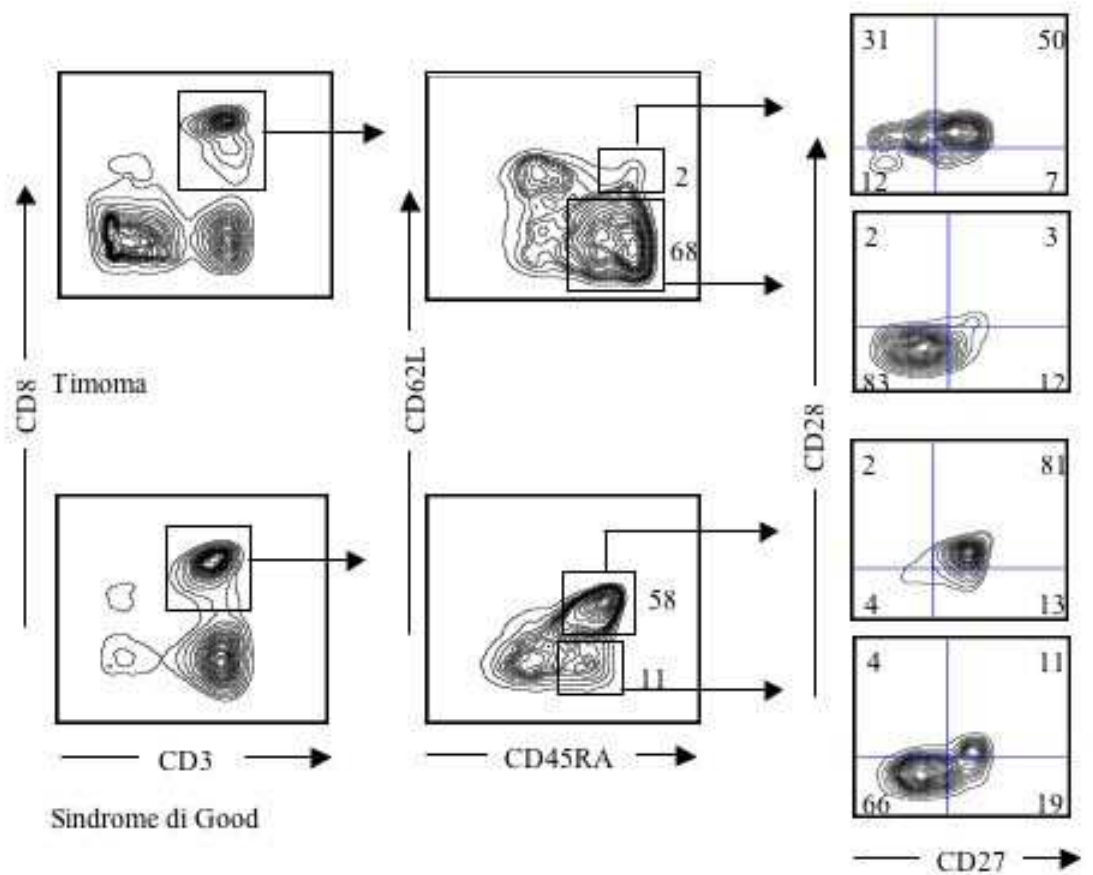
**Figura 8. Aumento dei linfociti T CD8+ CD45RA+ in pazienti con Sindrome di Good.**

A. Il grafico mostra la media delle percentuali di linfociti T CD8+ CD45RA+ osservate in pazienti con Sindrome di Good (n=16, nero), con Timoma (n=21, bianco), e nei controlli sani (n=20, grigio). Nei pazienti con Sindrome di Good si osserva un aumento significativo ( $p=0,0008$ ) della percentuale di cellule T CD8+ CD45RA+, rispetto ai controlli e ai pazienti con Timoma. B. Confronto tra le percentuali di linfociti T CD8+ CD45RA+ in 33 pazienti con Immunodeficienza Comune Variabile (CVI), di cui 12 B-linfopenici (CVI B-) e 31 non B-linfopenici (percentuale di linfociti B circolanti superiore al 6%, CVI B+), e quelle osservate nel gruppo dei controlli. Nei pazienti con CVI la B-linfopenia non correla con un aumento dei linfociti CD8+ CD45RA+, che risultano diminuiti in maniera non statisticamente significativa ( $p=0,07$ ) rispetto ai controlli.



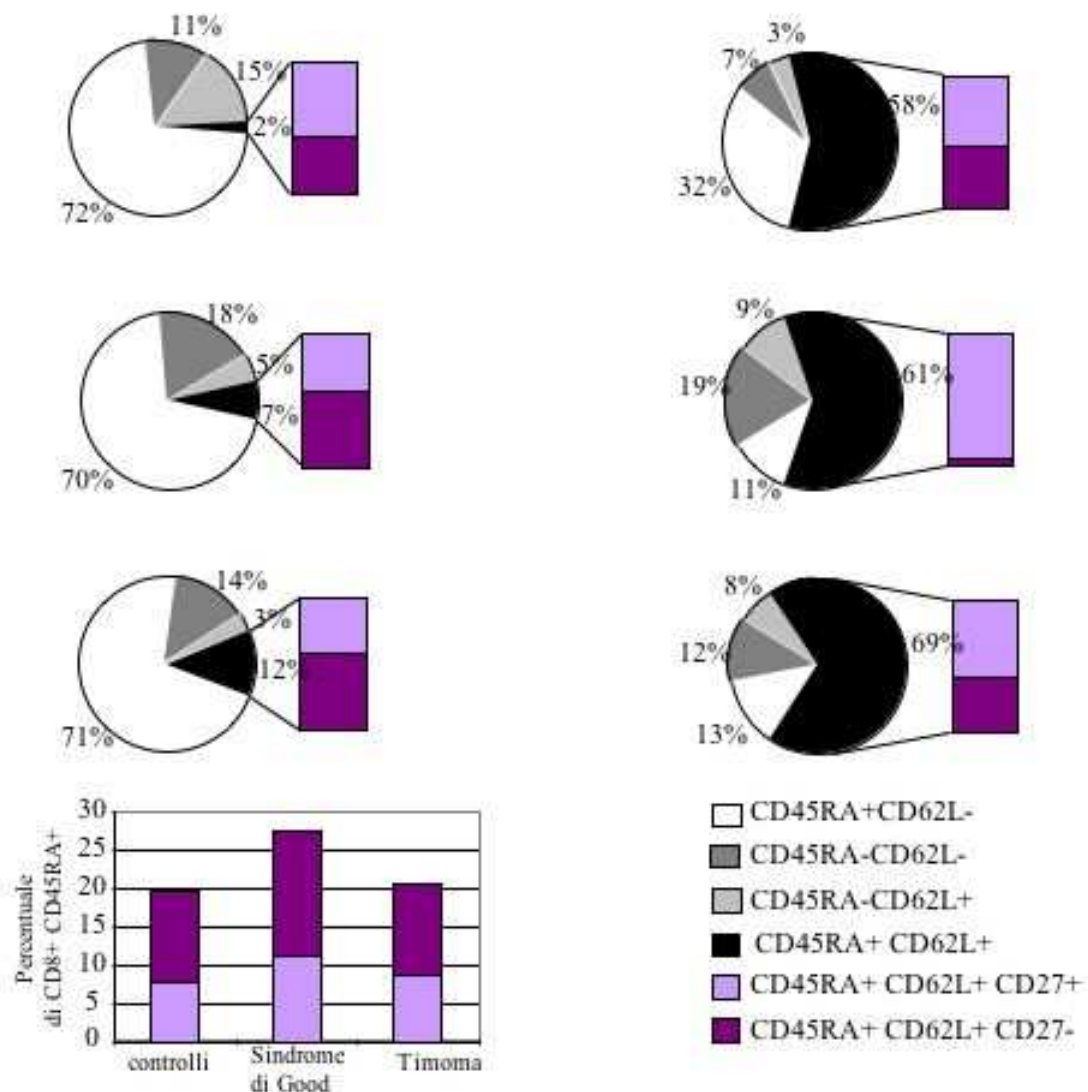
**Figura 9. Correlazione inversa tra la percentuale di linfociti B CD19+ e la percentuale di linfociti T CD8+ CD45RA+ nel sangue periferico di pazienti con Timoma.**

Il grafico mostra come al diminuire dei linfociti CD19+ sia associato un aumento dei linfociti T CD8+ CD45RA+ ( $r=0,6$ ,  $p=0,035$ ). Dei 16 pazienti con Sindrome di Good analizzati, 11 hanno più del 20% di linfociti CD8+ CD45RA+.



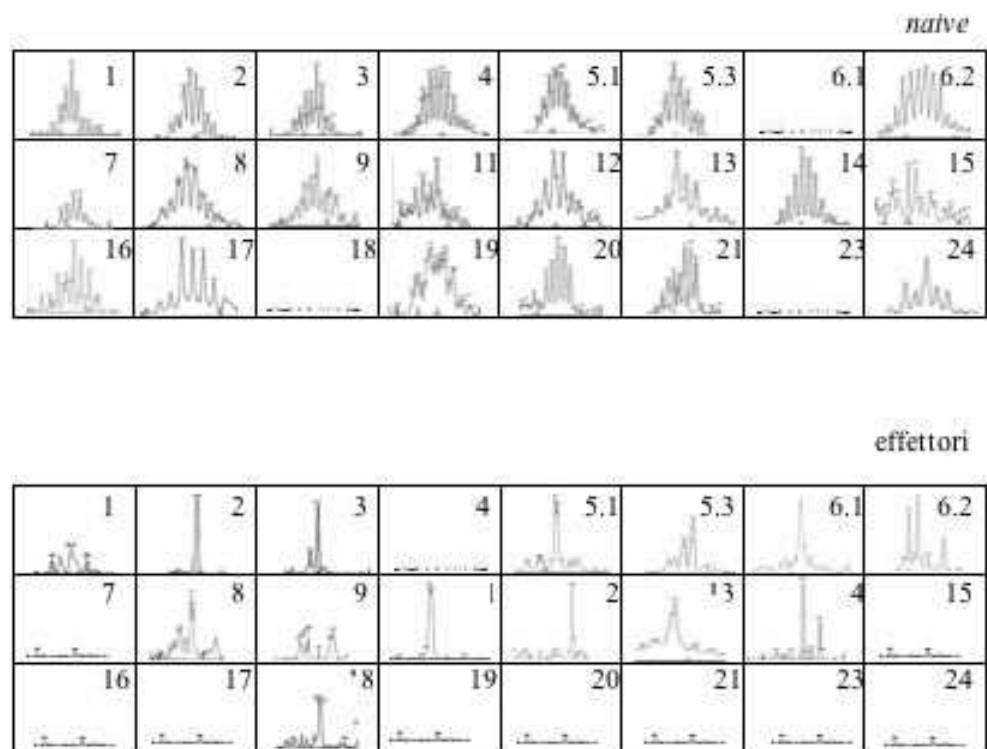
**Figura 10. Analisi multiparametrica dei linfociti T CD8+ in pazienti con Timoma e con Sindrome di Good.**

I diagrammi mostrano l'analisi citofluorimetrica dell'espressione delle molecole CD3, CD8, CD45RA, CD62L, CD27 e CD28 in un paziente con Timoma (pannello superiore) e in un paziente con Sindrome di Good (pannello inferiore). I diagrammi a sinistra si riferiscono all'espressione di CD3 e CD8 in linfociti individuati per dimensioni e granulosità; quelli centrali all'espressione di CD45RA e CD62L sui linfociti CD3+ CD8+. I diagrammi a destra mostrano l'espressione di CD27 e CD28 sulle cellule CD3+ CD8+ CD45RA+ CD62L+ (naive) e sulle cellule CD3+ CD8+ CD45RA+ CD62L- (effettori).



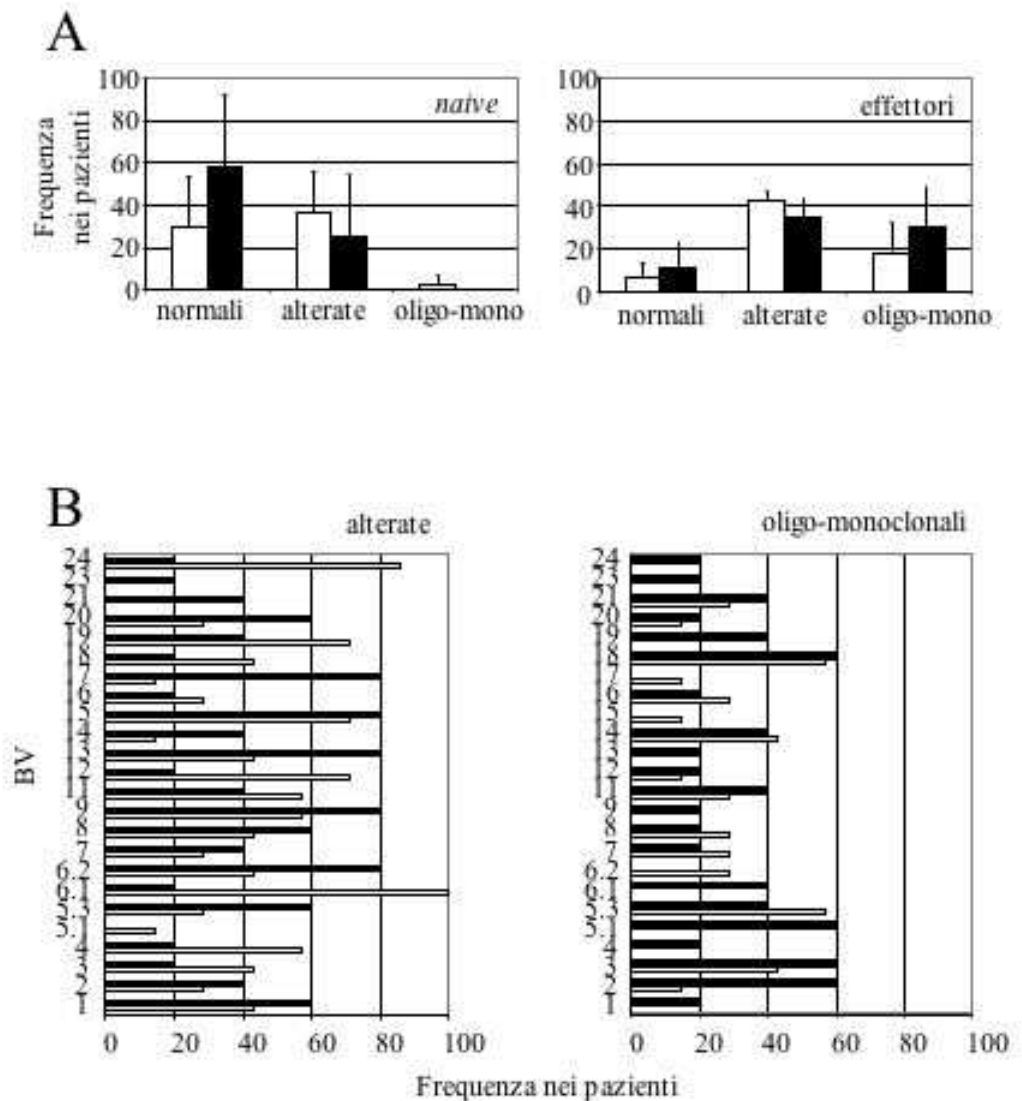
**Figura 11. Differente composizione della popolazione T CD8+ in pazienti con Timoma e Sindrome di Good.**

I grafici a torte mostrano la differente composizione del subset di linfociti T CD8+ in base all'espressione delle molecole CD45RA e CD62L. I grafici a sinistra si riferiscono a pazienti con Timoma, mentre quelli a destra mostrano i valori osservati in pazienti con Sindrome di Good. Delle cellule naive (CD45RA+ CD62L+) è indicata anche l'espressione della molecola CD27. Il grafico a barre mostra il contributo delle cellule CD27+ (lilla) e CD27- (viola) al totale dei linfociti CD8+ CD45+ circolanti in 15 pazienti con sindrome di Good, in 8 pazienti con timoma e in 18 controlli.



**Figura 12. Analisi del repertorio linfocitario T nei linfociti CD8+ *naive* ed effettori nella sindrome di Good.**

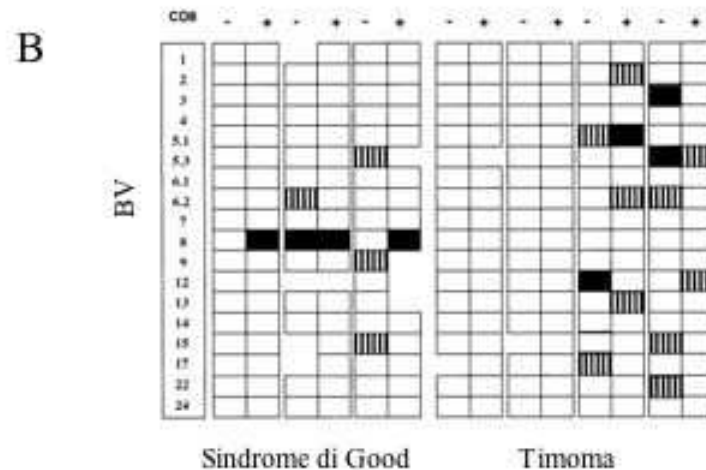
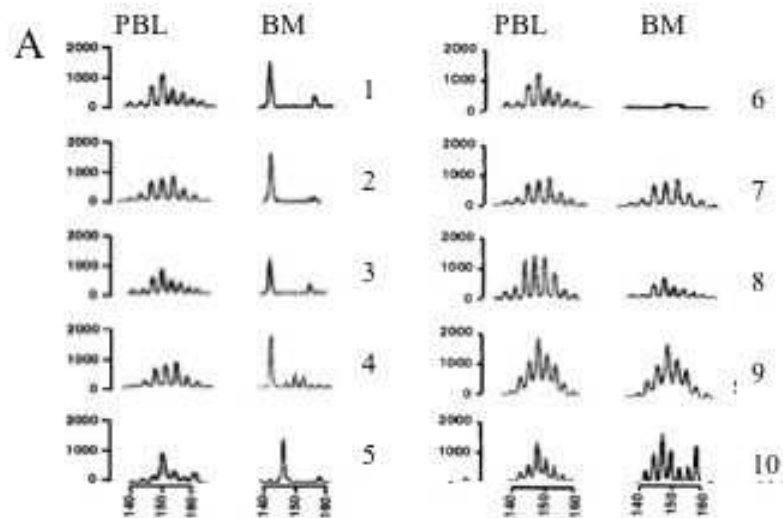
I due pannelli riportano gli elettroferogrammi delle 24 famiglie BV analizzate nei linfociti T CD8+ *naive* ed effettori (separate tramite sorting delle cellule CD45RA+ CD62L+ CD27+ e CD45RA+ CD62L- CD27-, rispettivamente) di un paziente con sindrome di Good (linfociti B circolanti = 0,5%). Ogni picco rappresenta un riarrangiamento di diversa lunghezza dello stesso segmento genico V $\beta$ . I numeri nei riquadri indicano la famiglia V $\beta$ .



**Figura 13. Analisi del repertorio V $\beta$  dei linfociti naive ed effettori in pazienti con Timoma.**

A. I grafici mostrano la media delle famiglie normali (profilo gaussiano, da 5 a 10 picchi), alterate (più di due picchi, profilo non gaussiano) ed oligo-monoclonali (uno o due picchi) nei linfociti T CD8<sup>+</sup> naive ed effettori (separate tramite sorting delle cellule CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> e CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, rispettivamente) in 7 pazienti con Timoma (barra bianca) e in 5 pazienti con Sindrome di Good (barra nera).

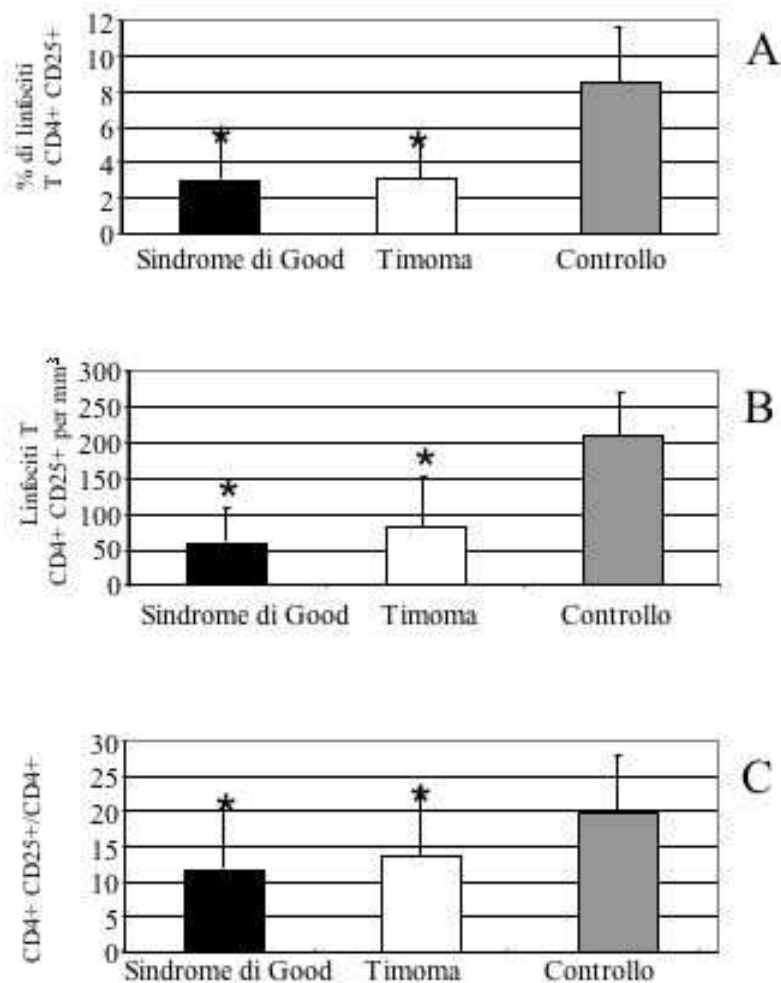
B. I grafici mostrano, per ogni famiglia BV, la percentuale di famiglie alterate o oligo-monoclonali nei pazienti con Timoma (barre bianche) o con Sindrome di Good (barre nere) analizzati.



**Figura 14. Analisi del repertorio V $\beta$  nel midollo osseo dei pazienti con Timoma e Sindrome di Good.**

Profilo dell'espressione della famiglia BV8 nei linfociti del sangue periferico e del midollo osseo (PBL e BM, rispettivamente) di 5 pazienti con Sindrome di Good (1-5), 2 pazienti con Timoma (6-7) e tre pazienti con patologie non correlate al Timoma (8,9, 10, Istiocitosi, Lupus Eritematoso Sistemico e Mielodisplasia, rispettivamente).

B. Schema riassuntivo del repertorio BV espresso nei linfociti CD8+ e CD8- (CD4) nel midollo dei 3 pazienti con Sindrome di Good e 5 con Timoma. Le caselle bianche, quelle barrate e quelle nere rappresentano rispettivamente famiglie con un profilo gaussiano, alterato od oligo-monoclonale. L'assenza della casella rappresenta l'assenza della famiglia V $\beta$ .



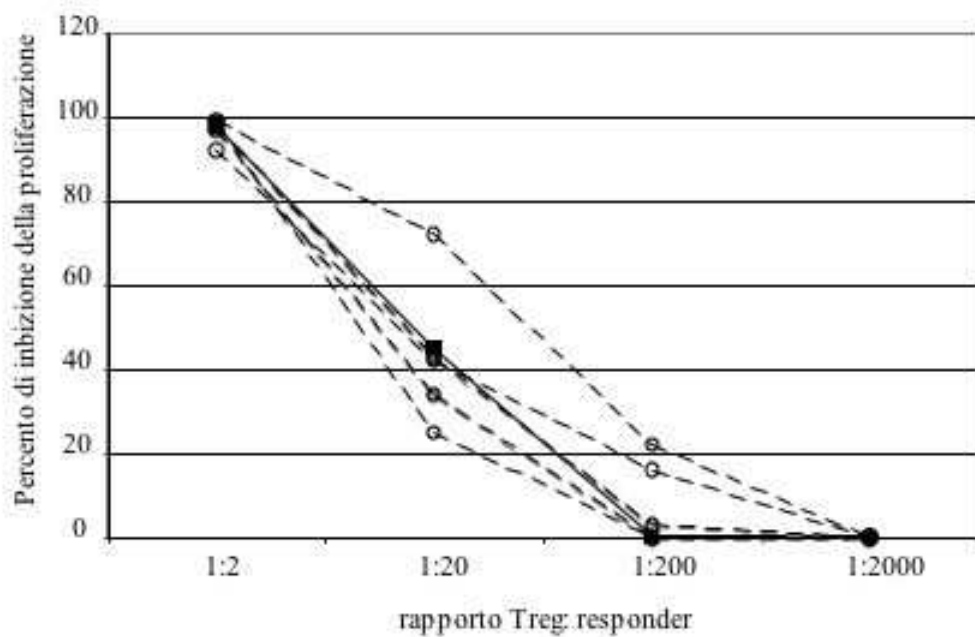
**Figura 15. Riduzione dei linfociti Treg CD4+CD25+ nei pazienti con Timoma.**

A. Gli istogrammi indicano la riduzione della percentuale delle cellule T CD4+ CD25+ (Treg) nei pazienti con Timoma rispetto ai controlli sani ( $p < 0,000001$ ). Non ci sono differenze significative tra i pazienti con Timoma e i pazienti con Sindrome di Good.

B. Riduzione del numero assoluto di linfociti CD4+ CD25+ in pazienti con Timoma e con sindrome di Good.

C. Nei due gruppi di pazienti si riduce il rapporto relativo tra cellule CD4+ CD25+ e linfocito T CD4+ totali ( $p = 0,03$ ).





**Figura 16. Funzionalità dei linfociti Treg in pazienti con Timoma.**

Il grafico mostra l'analisi della capacità regolatoria dei linfociti T CD4+ CD25+, misurata come soppressione della proliferazione dei linfociti autologhi CD4+ CD25- (responder). I 5 pazienti (○) con timoma (di cui 2 con Sindrome di Good) hanno una capacità soppressoria paragonabile a quella del controllo (■).

## Bibliografia

1. Paul W, Fundamental Immunology, fourth edition, 1999 Lippincot-Raven publishers
2. Janeway C, Travers P, Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, fifth edition, 2001. Current Biology Ltd/garland Publishing Inc.
3. Immunologia Cellulare e Molecolare, Abbas A., Lichtman, Pober, II edizione, 1994 Piccin.
4. Janeway CA. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. PNAS 2001; 98: 7461–7468.
5. Shi FD, Wong HB, Li H, et al. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. Nat Immunol 2000; 1: 245–251.
6. Beyan H, Buckley LR, Yousaf N, Londei M, Leslie RDG. A role for innate immunity in type 1 diabetes? Diabetes Metab Res Rev 2003; 19: 89–100.
7. Rowen L, Koop B. F, and Hood L, The Complete 685-kilobase DNA sequence of the Human  $\beta$  T Cell Receptor Locus, Science 1996, 272: 1755-1762.
8. Maryanski JL, Casanova JL, Falk K, Gournier H, Jaulin C, Kourilsky P, Lemonnier F A, L $\square$ thy, Rammensee HG, R $\square$ tzschke O, Servis C, and Lopez JA, The Diversity of Antigen-Specific TCR repertoires Reflects the relative Complexity of Epitopes Recognized, Hum. Immunol., 1997, 54:117-128.
9. Mackay I, Rosen FS. Innate immunity. N Engl J Med. 2000; 343(5): 338–343.
10. Zúñiga-Pflücker: T-cell development made simple. Nat Rev Immunol. 2004, 4
11. Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR, Blackburn CC: Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. Nat Immunol 2004, 5:546-553.

12. Gray DHD, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y and Boyd RL. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2005, 17:137–143
13. Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER: Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol* 2002, 169:2842-2845.
14. Gill J, Malin M, Sutherland JS, Gray DHD, Hollander G, Boyd RL: Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 2003, 195:28-50.
15. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC: Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* 2003, 198:757-769.
16. Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Forster R: Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* 2004, 200:481-491.
17. Anderson G, & Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev. Immunol.* 1, 31–40 (2001).
18. Ceredig R. & Rolink T. A positive look at doublenegative thymocytes. *Nature Rev. Immunol.* 2, 888–897 (2002).
19. Petrie, H. T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol. Rev.* 189, 8–19 (2002).
20. Rowen L., Koop B. F., and Hood L., The Complete 685-kilobase DNA sequence of the Human  $\beta$  T Cell Receptor Locus, *Science* 1996, 272: 1755-1762.
21. Fry TJ, Mackall CL: Current concepts of thymic aging. *Springer Semin Immunopathol* 2002, 24:7-22.
22. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, Schönitzer D, and Grubeck-Loebenstein B Long-Term Cytomegalovirus Infection Leads to Significant Changes in the Composition of the CD8 T-Cell Repertoire, Which May Be the Basis for an Imbalance in the Cytokine Production Profile in Elderly Persons *J.Virol*, Mar. 2005, 79 (6) 3675–3683

23. Haynes BF, Market ML, Sempowsky GD, Patel DD, Hale LP. The role of the Thymus in Immune Reconstitution in aging, Bone Marrow Transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol*, 2001 18: 529-560.
24. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997, 89: 3700-3707
25. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral t cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol*, 1996, 156:46094616
26. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: All repertoires are not created equal. 1997, *Immunol Today* 18: 245-251.
27. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712 (1999).
28. Campbell, J. J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J. Immunol.* 166, 877–884 (2001).
29. van Lier RAW, ten Berge IJM and Gamadia LE. Human CD8+ T-Cell Differentiation in Response to Viruses. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:1-8
30. Hoflich C, Docke WD, Busch A, Kern F, Volk HD. CD45RA<sup>bright</sup>/CD11a<sup>bright</sup> CD8+ T cells: effector cells. *Int Immunol*, 1998, 10:1837-1845.
31. Appay, V., Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, et al. Memory CD8 T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 2002.8:379.
32. Aandahl EM, Sandberg JK, Beckerman KP, Kjetil T, Moretto WJ, and Nixon DJ. CD7 Is a Differentiation Marker That Identifies Multiple CD8 T Cell Effector Subsets. *J Immunol* 2003, 170: 2349–2355.

33. Chen L, Co-inhibitory Molecules of the B7-CD28 Family in the Control of T-Cell Immunity. *Nature*, 2004 4: 36-348.
34. Hazenberg MD, Borghans JAM, de Boer RJ, Miedema F. Thymic Output: a bad TREC record. *Nat Immunol*, 2003 4: 97-98
35. Poulin J. F., Viswanathan M. N., Harris J. M., Komanduri K. V., Wieder E., Ringuette N., Jenkins M., McCune J. M., and Sekalay R. P., Direct Evidence for Thymic Function in Adult Humans, *J. Exp. Med.*, 1999: vol. 190: 479-486.
36. Douek D. C., McFarland R. D., Keiser P. H., Gage E. A., Massey J. M., Haynes M. A., Polis A. T., Feinberg M. B., Sullivan J.L., Jameson B. D., Zack J. A., Pick L.J.,Koup R.A., Changes in Thymic Function with Age and During the Treatment of HIV infection, *Nature* 1998, 369:690-695
37. Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. *J. Immunol*, 2005 174:6571-6576.
38. Detterbeck FD, Parsons AM. Thymic Tumors. *Ann Thorac Surg* 2004 77:1860 –9
39. Muller-Hermelink HK, Marx A: Pathological aspects of malignant and benign thymic disorders. *Ann Med* 1999, Suppl 2 5-14
40. Lewis JE, Wick MR, Scheithauer BW, Bernatz PE, Taylor WF. Thymoma. A clinicopathologic review. *Cancer* 1987;60:2727–2743.
41. Quintanilla-Martinez L, Wilkins EJ, Choi N, Efird J, Hug E, Harris NL. Thymoma. Histologic subclassification is an independent prognostic factor. *Cancer* 1994;74:606–17.
42. Suster S, Rosai J. Thymic carcinoma: a clinicopathologic study of 60 cases. *Cancer* 1991;67:1025–32.
43. Blumberg D, Burt ME, Bains MS, et al. Thymic carcinoma. Current staging does not predict prognosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:303–9.
44. Chalabreysse L, Roy P, Cordier J-F, Loire R, Gamondes J-P, Thivolet-Bejui F. Correlation of the WHO schema for the classification of thymic epithelial neoplasms with prognosis. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1605–11.

45. Maggi G, Casadio C, Cavallo A, Cianci R, Molinatti M, Ruffini E. Thymoma: results of 241 operated cases. *Ann Thorac Surg* 1991;51:152–156.
46. Rosai J, Sobin L. Histological typing of tumours of the thymus, 2nd ed. In: World Health Organization, International Histological Classification of Tumours. New York, Berlin: Springer, 1999:9–14.
47. Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981;48:2485–2492.
48. Wang L-S, Huang M-H, Lin T-S, Huang B-S, Chien K-Y. Malignant thymoma. *Cancer* 1992;70:443–50.
49. Elert O, Buchwald J, Wolf K. Epithelial thymus tumors—therapy and prognosis. *Thorac Cardiovasc Surg* 1988;36:109–13.
50. Souadjian JV, Enriquez P, Silverstein MN, Pe´pin J-M. The spectrum of diseases associated with thymoma. *Arch Intern Med* 1974;134:374–9.
51. Rosenow EC, Hurley BT. Disorders of the thymus. *Arch Intern Med* 1984;144:763–70.
52. Kondo K, Monden Y. Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 2003;76:878–84.
53. Kuo T, Shih LY. Histologic types of Thymoma associated with Pure Red Cell Aplasia: a study of five cases including a composite tumor of organoid thymoma associated with an unusual lipofibroadenoma.
54. Casadevall N, What is Pure Red Cell Aplasia? *Nephrol Dial Transplant* 2005. 20(suppl 4)
55. Masci AM, Palmieri G, Perna F, Montella L, Merkabaoui G, Sacerdoti G, Martignetti A, Racioppi L. Immunological findings in thymoma and thymoma-related syndromes. *Ann Med.* 1999 Oct;31 Suppl 2:86-9.
56. Masci AM, Palmieri G, Vitiello L, Montella L, Perna F, Orlandi P, Abbate G, Zappacosta S, De Palma R, Racioppi L. Clonal expansion of CD8+ BV8 T lymphocytes in bone marrow characterizes thymoma-associated B lymphopenia. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3106-8.

57. Montella L, Masci AM, Merkabaoui G, Perna F, Vitiello L, Racioppi L, Palmieri G. B-cell lymphopenia and hypogammaglobulinemia in thymoma patients. *Ann Hematol.* 2003 Jun;82(6):343-7
58. Montella L, Merkabaoui G, Vitiello L, Bulgarelli G, Sinagra G, Masci AM, Racioppi L, Palmieri G. Fatal immunodeficiency in a patient with thymoma and Good's syndrome. *Tumori.* 2005 Jul-Aug;91(4):361-3
59. Asakawa H, Kashihara T, Fukuda H, Yamamoto M A patient with thymoma and four different organ-specific autoimmune diseases. *Neth J Med*, 2002, 60.
60. Masaoka A, Yamakawa Y, Niwa H, et al. Thymectomy and malignancy. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994;8:251–3.
61. Bozzolo E, Bellone M, Quaroni N, Voci C, Sabbadini MG. Thymoma associated with systemic lupus erythematosus and immunological abnormalities. *Lupus* 2000, 9: 151-154.
62. Otton SH, Standen GR, Ormerod IE. T cell lymphocytosis associated with polymyositis, myasthenia gravis and thymoma. *Clin Lab Haematol*, 2000 22:307-308
63. Tani K, Matsunaga K, Katoh K, Kawai T, Ueda A, Kase M, Lie JT. Thymoma associated with rheumatoid arthritis after D-penicillamine treatment. *Br J Rheumatol*, 1998 37: 472-473
64. Okubo K, Kondo N, Okamoto T, Isobe J Ueno Y. Excision of an invasive thymoma: a cure for ulcerative colitis? *Ann Thorac Surg*, 2001, 71: 2013-2015
65. Lastoria S, Vergara E, Palmieri G, et al. In vivo detection of malignant thymic masses by indium-111-DTPA-D-Phe1- octreotide scintigraphy. *J Nucl Med* 1998;39:634–9.
66. Sasaki H, Ide N, Fukai I, Kiriyaama M, Yamakawa Y, and Fujii Y. Gene Expression Analysis Of Human Thymoma Correlates With Tumor Stage. *Int. J. Cancer* 2002 101: 342–347
67. Sasaki H, Ide N, Yukiue H, Kobayashi Y, Fukai I, Yamakawa Y, Yoshitaka Fujii. Arg and DAP3 expression was correlated with human thymoma stage. *Clin Exp Met* 2004 21: 507–513.

68. Herens C, Radermecker M, Servais A, Quatresooz P, Jardon-Jeghers C, Bours V, de Leval L. Deletion (6)(p22p25) is a recurrent anomaly of thymoma: report of a second case and review of the literature. *Canc Gen and Cytogen* 2003 146: 66–69
69. Nicodeme F, Geffroy S, Conti M, Delobel B, Soenen V, Gardel N, Porte H, Copin MC, Lai JM, and Andrieux J. Familial Occurrence of Thymoma and Autoimmune Diseases with the Constitutional Translocation t(14;20)(q24.1;p12.3). *Gen, Chrom Can* 2005 44:154–160
70. Good RA. Agammaglobulinaemia—a provocative experiment of nature. *Bulletin of the University of Minnesota* 1954;26:1–19.
71. Good RA, Maclean LD, Varco RL, Zak SJ. Thymic tumor and acquired agammaglobulinemia: a clinical and experimental study of the immune response. *Surgery*. 1956 Dec;40(6):1010-7.
72. Good RA. Cellular immunology in a historical perspective *Immunological Reviews* 2002 Vol 185: 136–158
73. Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS scientific committee. International Union of Immunological Societies. *Clin Exp Immunol* 1999;118(suppl 1):1–28.
74. Watts RG, Kelly DR. Fatal varicella infection in a child associated with thymoma and immunodeficiency syndrome. *Med Pediatr Oncol* 1990;18:246–51.
75. Tarr PE, Sneller MC, Mechanic LJ, et al. Infections in patients with immunodeficiency with thymoma (Good syndrome). Report of 5 cases and review of the literature. *Medicine* 2001;80:123–33.
76. Raschal S, Siegel JN, Huml J, et al. Hypogammaglobulinaemia and anemia 18 years after thymoma resection. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:846–8.
77. Morgenthaler TI, Brown LR, Colby TV, et al. Thymoma. *Mayo Clin Proc* 1993;68:1110–23.
78. P Kelleher, S A Misbah What is Good's syndrome? Immunological abnormalities in patients with thymoma *J Clin Pathol* 2003;56:



79. Beck S, Slater D, Harrington CI. Fatal chronic cutaneous herpes simplex associated with thymoma and hypogammaglobulinaemia. *Br J Dermatol* 1981;105:471–4.
80. Jeandel, C, Gastin I, Blain H, et al. Thymoma with immunodeficiency (Good syndrome) associated with selective cobalamin malabsorption and benign IgM-K gammopathy. *J Intern Med* 1994;235:179–82.
81. MacLean LZ, Zak SJ, Varco RL, et al. Thymic tumor and acquired agammaglobulinaemia: a clinical and experimental study of the immune response. *Surgery* 1956;40:1010–17.
82. Gafni J, Michaeli D, Heller D. Idiopathic acquired agammaglobulinaemia associated with thymoma. Report of two cases and review of the literature. *N Engl J Med* 1960;263:536–41.
83. Jacox R, Mongan ES, Hanshaw JB, et al. Hypogammaglobulinaemia with thymoma and probable pulmonary infection with cytomegalovirus. *N Engl J Med* 1964;271:1091–6.
84. Te Velde K, Huber J, Van der Slikke LB. Primary acquired hypogammaglobulinaemia, myasthenia and thymoma. *Ann Intern Med* 1966;65:554–9.
85. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* 1993;86:31–42.
86. Hoffacker V, Schultz A, Tiesinga JJ, Gold R, Schalke B, Nix W, Kiefer R, Muller-Hermelink HK, Marx A. Thymoma s alter the T-cell subset composition in the blood: a potential mechanism for thymoma-associated autoimmune disease. *Blood* 2000 96:3872-3879
87. Takeuchi Y, Fujii Y, Okumura M, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. Accumulation of immature CD3-CD4+CD8- single-positive cells that lack CD69 in epithelial cell tumors of the human thymus. *Cell Immunol.* 1995;161:181-187.
88. McCune CA, Hughes S, Unsworth DJ. Thymoma, autoimmunity and fatal immunodeficiency. *QJM* 2000;93:559–60.

89. Kauffman CA, Linnemann CC, Jr, Alvira MM. Cytomegalovirus encephalitis associated with thymoma and immunoglobulin deficiency. *Am J Med* 1979;67:724–8.
90. Huissoon AP, Davies G, Cox RA, Sloper CML, Thomson BJ and Robins RA. Loss of cytomegalovirus-specific immunological memory in a patient with thymoma. *Clin Exp Immunol* 2002; 129:297–301
91. Litwin SD, Zanjani ED. Lymphocyte suppressing both immunoglobulin and erythroid differentiation in hypogammaglobulinaemia. *Nature* 1977;266:57–8.
92. Hayward AR, Paolucci P, Webster ADB, et al. Pre-B cell suppression by thymoma patients' lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1982;48:437–42.
93. Gorski J., Yassai M., Zhu X., Kissela B., Keever C. and Flomenberg N.: Circulating T Cell Repertoire Complexity in Normal Individuals and Bone Marrow Recipients Analysed by CDR3 Size Spectratyping, *J Immunol*, 1994: 152: 5109-5119.
94. von Bohemer H. Shaping the T Cell repertoire. *J. Immunol*, 2005 175:7067-7068
95. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, Saoudi A, and Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4 CD25 T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis *Blood*. 2005 105:735-741
96. Strobel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, Kerkau T, Elert O, Murumagi A, Sillanpaa N, Peterson P, Hummel V, Rieckmann P, Burek C, Schalke B, Nix W, Kiefer R, Muller-Hermelink HK, and Marx A. Selective Loss of Regulatory T Cells in Thymomas. *Ann Neurol* 2004 56:901–904
97. Charles RJ, Sabo KM, Kidd PG, et al. The pathophysiology of pure red cell aplasia: implications for therapy. *Blood* 1996;87:4831–8.
98. Champagne P, Ogg GS, King A, Knabenhans, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lippk M, Foersterk R, Rowland-Jones S, SeÂkal RP, McMichael AJ & Pantaleo G. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, 2001 401:106-113.
99. Fleury, S. et al. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med* 1998 4, 794-801.

100. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell Memory. *Science* 2003 300:337-339
101. Sun JJ, Bevan MJ. Defective CD8T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003 300:339
102. Kaech SM, Ahmed R. CD8 T cells remember with a little help. *Science* 2003 300:263-265
103. Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L, Manjunath N, and Lieberman J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood*. 2001;98:156-164
104. Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, Casti A, Franceschi C, Passeri M, and Sansoni P. Shortage of circulating naive CD81 T cells provides new insight on immunodeficiency in aging. *Blood*. 2000;95:2860-2868
105. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, Schonitzer D, Grubeck-Loebenstein B. Long-Term Cytomegalovirus Infection Leads to Significant Changes in the Composition of the CD8 T-Cell Repertoire, Which May Be the Basis for an Imbalance in the Cytokine Production Profile in Elderly Persons. *J. Virol*, 2005, 79: 3675–3683
106. Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Mynard K, Okecha G, Hicks R, and Sissons JG. 1999. Human virus-specific CD8 CTL clones revert from CD45RO<sup>high</sup> to CD45RA<sup>high</sup> in vivo: CD45RA<sup>high</sup> CD8 T cell comprise both naive and memory cells. *J. Immunol*. 1999 162:7080–7087.
107. Crispin JC, Vargas MI, et al. Immunoregulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2004, 3: 45-51
108. Zhang X, Koldzic D, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+ CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol*. 2004, 16: 249-256

109. Liu MF, Wang LL, et al. Decreased CD4+ CD25+ T cells in peripheral blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* , 59: 198-202
110. Huang YM, Pirskanen R, Circulating CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- T cells in Myasthenia Gravis and in relation to thymectomy. *Scand. J. Immunol.*, 59: 408-414.