

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Immunologia, Immunopatologia
Sperimentale e Comparata

Ciclo XXIII

Attivazione delle cellule Natural Killer durante
infezione Acuta da virus dell'epatite C

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Attilio CORRADI

Tutor:
Chiar.mo Prof. Paolo BORGHETTI

Dottorando: Barbara AMADEI

INDICE

RIASSUNTO	2
INTRODUZIONE	4
1. Caratteristiche biologiche del virus dell'epatite C	4
Ciclo vitale di HCV	7
2. Cenni di immunopatogenesi dell'infezione da HCV	9
3. Immunità innata	12
Cellule Natural Killer	13
SCOPO DELLO STUDIO	16
MATERIALE E METODI	17
Pazienti	17
Anticorpi monoclonali e citofluorimetria a flusso	17
Isolamento di cellule mononucleate dal sangue periferico	21
Produzione di IFN- γ	21
Degranulazione	22
Capacità litica	22
Analisi statistica	22
RISULTATI	23
Frequenza delle cellule NK in pazienti con infezione acuta da HCV	23
Espressione recettori: NKG2D e KIR in fase acuta	24
Attività funzionale delle cellule NK	24
Attività citotossica delle cellule NK	25
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	28
FIGURE	31
BIBLIOGRAFIA	37

RIASSUNTO

Il virus dell'epatite C (HCV) è l'agente eziologico di epatiti virali che durante la fase acuta sono spesso asintomatiche, e quindi difficili da diagnosticare. Questo virus è in grado di stabilire un'infezione cronica persistente nella maggioranza degli individui esposti e la risposta immunitaria contro HCV gioca un ruolo importante sia nel controllo virale che nella patogenesi della malattia. Molti lavori hanno studiato il ruolo della risposta dell'immunità adattativa durante la fase acuta dell'infezione in relazione all'evolvere di malattia. La risoluzione spontanea dell'infezione da HCV è stata associata a risposte CD4 e CD8 vigorose e multispecifiche, mentre l'indebolimento dell'immunità adattativa è stato osservato nell'infezione cronica.

Il sistema dell'immunità innata è stato studiato poco nell'infezione acuta da virus C, ed il proprio ruolo nel determinare l'evoluzione di malattia è ancora da chiarire.

Comunque, è stata dimostrata l'attivazione delle cellule T durante la fase acuta dell'infezione e sono state descritte anomalie di queste cellule e delle loro subpopolazioni in pazienti con infezione cronica da virus C.

Le cellule Natural Killer (NK) sono uno dei principali attori dell'immunità innata, vale a dire l'insieme di quelle componenti delle nostre difese comparse precocemente nell'evoluzione e che costituiscono vere e proprie fondamenta del sistema immunitario. Le cellule NK sono essenziali nelle prime fasi dopo un'infezione, non solo per controllare il virus, ma anche per un'efficiente induzione della risposta adattativa. E' stato riportato un effetto inibitorio da parte delle cellule NK, sulla proteina (HCV)-E2 del virus dell'epatite C, ma sono ancora da definire le caratteristiche delle risposte delle cellule NK nella fase acuta dell'epatite C.

Il controllo delle cellule NK è determinato dalla combinazione di espressione di recettori di inibizione e di attivazione. E' probabile che, l'integrazione delle cellule NK e dei segnali derivati da questi recettori, determini se le cellule si attiveranno.

Per questo motivo lo scopo dello studio è stato quello di caratterizzare la funzione ed il fenotipo delle cellule NK durante la fase acuta dell'infezione, confrontando pazienti che cronicizzano e pazienti che guariscono spontaneamente.

Sono stati reclutati 22 pazienti, di cui 14 con evoluzione cronica di malattia e 8 che sono guariti spontaneamente.

E' stato osservato un aumento di espressione del recettore NKG2D sia sulle cellule NK CD56^{Dim} e CD56^{Bright} nei pazienti con epatite acuta, indipendentemente dall'esito di malattia, rispetto ai controlli sani. Anche la produzione di IFN- γ e la capacità litica delle cellule NK è più alta negli individui con infezione acuta C rispetto ai controlli sani. L'analisi dei subset mostra un aumento di produzione di IFN- γ sia nel gruppo 1 che nel gruppo 2 HLA-C-KIR-specifico. L'aumento del CD107 è espresso solo sulle cellule NK del gruppo 1 HLA-C KIR-specifico ed è massimo in coloro che guariscono spontaneamente. In conclusione i risultati mostrano che durante la fase acuta dell'infezione da virus C, le cellule NK sono attivate indipendentemente dall'esito di malattia, e non mostrano un effetto soppressivo nei confronti di HCV da parte delle cellule NK.

INTRODUZIONE

1. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DEL VIRUS DELL'EPATITE C

Il virus dell'epatite C (HCV) è un virus ad RNA, a catena singola e a polarità positiva. Il genoma è costituito da circa 9401 nucleotidi organizzati in un lungo ed ininterrotto *open reading frame* (ORF), che codifica una poliproteina di 3010-3011 aminoacidi. In base all'organizzazione genomica e all'omologia di alcune regioni aminoacidiche, l'HCV viene incluso nella famiglia dei Flaviviridae, che comprende i Flavivirus umani e i Pestivirus animali⁽¹⁻⁷⁾.

Analogamente ad altri flavivirus, il genoma di HCV (Fig 1) presenta in posizione 5' (aminoterminale) una breve sequenza nucleotidica denominata 5'-UTR (5' *untranslated region*), non tradotta in proteina, che è coinvolta nella traduzione dell'RNA e che contiene nella sua parte prossimale una struttura a forcina, che si comporta come una IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*).

Tale regione è seguita da un'unica lunga sequenza nucleotidica che codifica una singola proteina, che viene scissa ad opera di proteasi, sia di origine cellulare che virale, in proteine strutturali e non strutturali. All'estremità aminoterminale è localizzata la proteina core, fortemente basica, capace di legare l'RNA virale, che ha la funzione di formare il nucleocapside⁽⁸⁾. Essa è seguita da due glicoproteine, E1 ed E2², che si ritiene rappresentino le componenti strutturali dell'*envelope* virale.

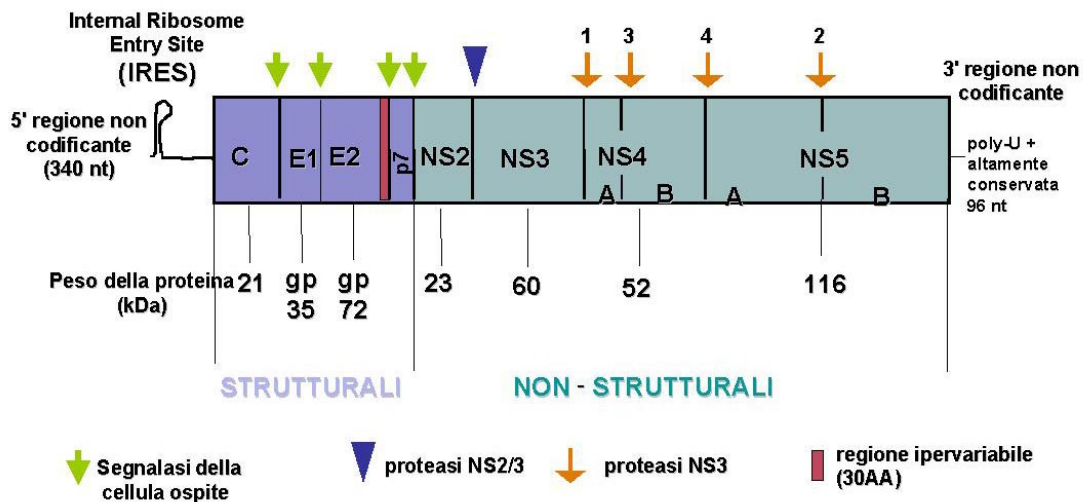


Figura 1. Genoma di HCV /

E2 è inoltre in grado di legare la molecola CD81, presente sulla superficie di tutte le cellule, che si ritiene essere uno dei componenti della struttura recettoriale cellulare del virus⁽⁹⁻¹⁰⁾. La molecola dell'envelope, rappresenta anche il target degli anticorpi neutralizzanti. All'interno di E2 si trova una regione ipervariabile (HVR1), che presenta una stretta somiglianza con il "loop" V3 della glicoproteina gp120 dell'HIV, bersaglio della risposta neutralizzante. Tra E2 ed NS2 si trova un piccolo gene che codifica una proteina denominata p7, la cui funzione non è ben conosciuta e che talora rimane associata ad E2, portando alla formazione di un complesso E2-p7, il cui ruolo non è noto.

Le porzioni successive del genoma codificano le proteine non strutturali. NS2 è una metalloproteasi che catalizza la scissione di NS3⁽¹¹⁻¹⁵⁾. NS3 presenta due distinti domini proteici: uno in regione N-terminale con funzione serin-proteasica (che catalizza le scissioni che riguardano la porzione più a valle della regione non strutturale, NS4a/NS4b, NS5a/NS5b) e l'altro all'estremità carbossilica con funzione di elicasi (coinvolta nello svolgimento dell'RNA virale al momento della replicazione genomica)⁽¹³⁾. NS4a, idrofobica, è un cofattore della serin-proteasi

(NS3), necessaria per permettere a quest'ultima la scissione di NS5b. NS4b è spiccatamente idrofobica e per questo capace di associarsi alle membrane, ma con funzione praticamente sconosciuta. NS5a e NS5b sono anch'esse molecole idrofobiche. Il ruolo della prima non è ancora noto, mentre la seconda funzionerebbe da RNA-polimerasi-RNA dipendente^(8,13,15).

La porzione C-terminale è costituita da una regione 3'-UTR (*3' untranslated region*), non codificante coinvolta nella replicazione del genoma. Poiché l'RNA polimerasi-RNA dipendente manca di quell'attività che permette, in altri tipi di polimerasi, di riparare gli errori di incorporazione nucleotidica che avvengono durante la replicazione, il genoma dell'HCV (come del resto quello degli altri virus ad RNA) presenta un notevole grado di variabilità. La frequenza delle mutazioni è differente a seconda delle regioni. Ne consegue che sequenze particolarmente conservate sono la 5' UTR e quelle codificanti la proteina core e NS3, dato che sono coinvolte in funzioni essenziali per il ciclo vitale. I geni che codificano l'envelope virale sono invece quelli soggetti a maggiore variabilità⁽¹⁶⁾.

Il livello di variabilità è molto elevato e varianti virali multiple possono coesistere in uno stesso paziente. Per questi motivi, HCV è presente negli organismi infettati come "quasispecie", cioè un gruppo eterogeneo di genomi contenenti una sequenza dominante e numerose varianti.

Secondo la classificazione suggerita da Simmonds, appartengono allo stesso genotipo quei virus che presentano una identità nucleotidica di almeno il 70%, mentre rientrano nello stesso sottotipo quegli isolati con identità pari ad almeno l'80%. In tal modo si sono identificati 6 genotipi (identificati con numeri arabi da 1 a 6) e circa 20 sottotipi (indicati con lettere dell'alfabeto). Numerosi studi avrebbero evidenziato come i distinti genotipi possano correlare con l'evoluzione della malattia, l'infettività e la risposta alla terapia antivirale. Il genotipo 1, soprattutto di sottotipo

b, si assocerebbe a quadri clinici più severi, quali cirrosi ed epatocarcinoma; mentre il genotipo 2a sembrerebbe rispondere meglio alla terapia con interferone rispetto al genotipo 1b.

Ciclo vitale di HCV. Le fasi del ciclo replicativo possono essere raggruppate in 5 passaggi (fig 2):

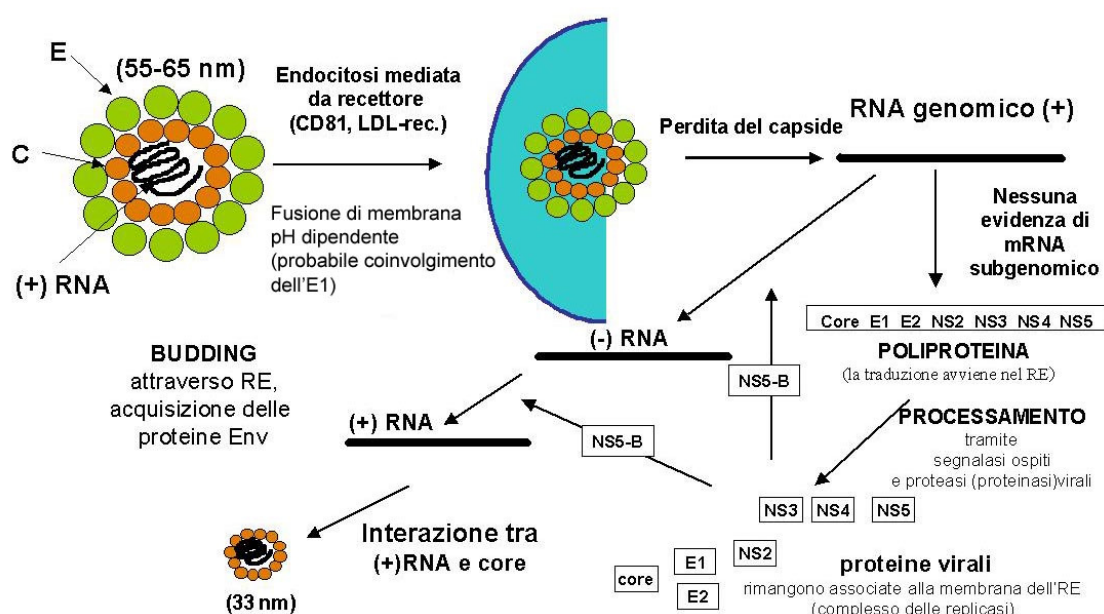


Figura 2. Replicazione di HCV

- 1) ingresso nella cellula ospite (epatocita o altro tipo cellulare) e liberazione dell'RNA genomico (+) dalla particella virale nel citoplasma. L'ingresso nella cellula avviene attraverso molecole di superficie cellulare e recettori presenti sul virione.
- 2) Traduzione dell'RNA, processamento della poliproteina e formazione di un complesso di replicazione associato alle membrane del reticolo endoplasmatico.
- 3) Utilizzo del filamento a polarità positiva da parte del complesso di replicazione, formato dalle proteine non strutturali, per la sintesi del filamento intermedio a polarità negativa.

- 4) Produzione di nuovi filamenti a polarità positiva che possono a loro volta essere usati per la sintesi del filamento complementare a polarità negativo, per l'espressione della poliproteina o per la formazione di nuovi virioni.
- 5) Rilascio del virus dalla cellula infettata, tramite estroflessione della membrana cellulare (budding) .

2. CENNI DI IMMUNOPATOGENESI DELL' INFEZIONE DA HCV

Studi epidemiologici hanno mostrato che HCV è responsabile di oltre il 90% delle epatiti post-trasfusionali e di circa il 60% delle forme sporadiche senza una documentata esposizione parenterale.

Categorie a rischio per l'infezione risultano essere i soggetti politrasfusi, gli emofilici, i pazienti emodializzati, gli omosessuali e i tossicodipendenti.

Il periodo di incubazione dell'infezione da HCV è variabile da 2 a 26 settimane, con una durata più frequentemente compresa fra le 7 e le 8 settimane. Nella maggior parte dei casi la malattia ha un decorso asintomatico; solo il 25% dei pazienti presenta un'evidente sintomatologia. Rara è l'epatite acuta fulminante.

Un'elevata percentuale di individui che contraggono l'infezione da HCV non è in grado di eliminare il virus dall'organismo e sviluppa un'infezione cronica che può evolvere in cirrosi (in circa il 70% dei casi) e successivamente in epatocarcinoma. Pur non potendosi escludere che il danno epatico mediato da HCV possa essere almeno in parte causato da un effetto citopatico diretto del virus, studi più recenti sembrano indicare l'importanza della risposta immunitaria dell'ospite, non solo nella protezione contro il virus, ma anche nel determinismo del danno epatico⁽¹⁷⁾. La valutazione dell'effetto citopatico diretto di HCV risulta fortemente complicata dal fatto che il virus non infetta efficientemente epatociti o linee cellulari umane *in vitro*. Questo fatto ha finora reso estremamente complessa anche la valutazione del ruolo del sistema immune nella patogenesi dell'infezione.

La risposta del sistema immunitario ad un'infezione virale è mirata sia all'eliminazione delle particelle virali libere che dei virus nella loro localizzazione intracellulare. Il primo obiettivo è principalmente conseguito tramite gli anticorpi, prodotti dai linfociti B in seguito al riconoscimento di antigeni secreti all'esterno

delle cellule infettate (immunità umorale)⁽¹⁸⁾. Per il riconoscimento del virus intracellulare, e quindi per l'eliminazione delle cellule infettate, il sistema immune ha sviluppato un altro meccanismo di controllo basato sul riconoscimento da parte dei linfociti T di brevi sequenze aminoacidiche derivate dalla processazione di antigeni virali sintetizzati all'interno delle cellule infettate (immunità cellulo-mediata). Nella risposta immunologica sono coinvolte due principali popolazioni T linfocitarie, distinguibili sulla base dei marcatori espressi sulla loro membrana (CD4 e CD8) e delle differenti funzioni svolte. I linfociti T citotossici (CTL) sono attivati dal riconoscimento dei peptidi virali associati a molecole HLA di classe I (molecole costitutivamente presenti sulla maggior parte delle cellule umane); in conseguenza dell'attivazione, i linfociti eliminano il virus o distruggendo la cellula infetta o attraverso un meccanismo anti-virale non-litico mediato dal rilascio di citochine⁽¹⁹⁾.

A differenza dei linfociti T CD8+ che riconoscono antigeni endogeni, i linfociti CD4+ riconoscono generalmente frammenti peptidici derivati dalla processazione di antigeni extracellulari secreti all'esterno della cellula infettata, associati a molecole HLA di classe II (molecole espresse costitutivamente su macrofagi, linfociti B, cellule dendritiche). I linfociti CD4+ esprimono funzione regolatrice, secernendo citochine capaci di modulare l'attività litica dei linfociti T CD8+ ed essenziali per l'attivazione dei linfociti B⁽²⁰⁾.

Per una completa *clearance* virale occorre che si instauri una rapida e coordinata risposta immunitaria sia umorale che cellulare contro molteplici antigeni virali. Inoltre, si pensa che il decorso delle infezioni causate da virus in grado di determinare malattie croniche, sia fortemente influenzato dal rapporto tra la velocità di replicazione virale e la prontezza del sistema immunitario ad organizzare una risposta antivirale rapida, multispecifica ed efficiente, capace di inibire l'infezione prima che il virus possa mettere in atto meccanismi per eludere la sorveglianza

immunitaria. Poiché la risposta umorale è soprattutto finalizzata alla neutralizzazione di particelle virali libere, il ruolo proteggente cruciale sembra essere svolto dai linfociti T.

3. IMMUNITA' INNATA

L'immunità aspecifica o innata comprende un gruppo di meccanismi di barriera non specifici per un particolare patogeno: anatomica, fisiologica, fagocitaria, infiammatoria.

La barriera anatomica rappresenta la prima linea di difesa nei confronti degli agenti infettanti attraverso la cute e la superficie delle mucose. La cute intatta previene l'ingresso della maggior parte dei patogeni. Le mucose attraverso la produzione di saliva, lacrime, secrezioni, lavano via potenziali agenti infettanti, con la produzione del muco intrappolano i microrganismi estranei, attraverso le ciglia li espellono.

La barriera fisiologica comprende il pH, la temperatura corporea, alcuni fattori solubili. Il basso pH dello stomaco è una barriera innata alle infezioni, in quanto sono pochi i microrganismi ingeriti, che sopravvivono a questo elevato grado di acidità. La temperatura corporea inibisce lo sviluppo di alcuni germi. I fattori solubili (lisozima, complemento, interferone) contribuiscono all'immunità aspecifica.

La fagocitosi, operata da cellule specializzate quali macrofagi, monociti, granulociti, cellule NK, è un altro importante meccanismo innato di difesa grazie alla capacità di riconoscere, ingerire e distruggere particelle o cellule estranee all'organismo.

L'attivazione dell'immunità aspecifica avviene tramite i recettori di membrana che, insieme al complemento e alle citochine, sono in grado di riconoscere in maniera non selettiva particelle comuni di microrganismi patogeni, quali lipopolisaccaridi, glicani, mannani, RNA a doppia elica, e di attivarsi contro di essi.

Il danno causato da una ferita o dall'invasione di un patogeno induce una risposta infiammatoria, caratterizzata da vasodilatazione, aumento della permeabilità capillare, afflusso di fagociti dai capillari e loro migrazione nel tessuto fino alla sede della risposta infiammatoria (chemiotassi).

L'immunità specifica o acquisita riconosce ed elimina selettivamente molecole o microrganismi estranei all'organismo. Essa è quindi una risposta antigenica, che permette di distinguere differenze piccolissime tra gli antigeni stessi.

Presenta quattro caratteristiche fondamentali: specificità antigenica, diversità, discriminazione tra self e non-self e memoria.

La diversità consiste nella capacità di generare un grande numero di molecole di riconoscimento diverse, la qual cosa permette il riconoscimento di miliardi di strutture differenti presenti sugli antigeni. L'avvenuto riconoscimento antigenico con conseguente risposta determina una risposta immunologica, per cui ulteriori incontri con lo stesso antigene indurranno una risposta immunitaria più potente.

Immunità acquisita ed Immunità innata non sono comunque indipendenti l'una dall'altra, bensì cooperano formando una rete interattiva che agisce come efficace barriera contro gli agenti estranei all'organismo: i fagociti, fondamentali per la risposta aspecifica, generano segnali di pericolo, che a loro volta stimolano la risposta specifica.

Il sistema immunitario risponde allo stimolo antigenico con un'immunità cellulo-mediata o con una risposta immunoumorale.

Cellule Natural Killer. Le cellule Natural Killer o cellule NK sono cellule del sistema immunitario, particolarmente importanti nel riconoscimento e distruzione di cellule tumorali e infette da virus.

Sono in grado di produrre citochine, come interferone gamma. Le cellule NK non necessitano di attivazione, sono infatti indipendenti dal sistema immunitario specifico ed esplicano un'importante azione come prima difesa tipica dell'immunità innata.

Le Natural Killer sono state identificate originariamente su base puramente funzionale, in relazione alla loro capacità di uccidere varie linee tumorali senza una previa attivazione. Proprio questa caratteristica funzionale ne ha determinato la denominazione di “*killer naturale*”. Questi linfociti sono definiti fenotipicamente dalla presenza di CD56 sulla superficie cellulare e dall’assenza di CD3 (CD56+CD3-). Ci sono due sottopopolazioni che esprimono differenti livelli di CD56; la maggioranza di queste sono le CD56^{Dim} (circa 90%), sono i principali mediatori di citotossicità, mentre la minoranza è rappresentata dalle CD56^{Bright} (circa 10%), ed esercitano attività citochinica con produzione di interferone- γ (IFN- γ)⁽²²⁻²⁴⁾.

Il controllo delle cellule NK è determinato dalla combinazione di espressione di recettori di inibizione e di attivazione. E’ probabile che, l’integrazione delle cellule NK e dei segnali derivati da questi recettori, determini se le cellule si attiveranno. Tra i recettori con capacità inibitoria ci sono NKG2A e recettori immunoglobulinici Killer (KIR), mentre recettori che hanno capacità di attivazione sono NKG2D e i recettori naturali di citotossicità⁽²⁵⁻²⁷⁾.

I KIRs legano il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I; in particolare KIR2DL2 e KIR2DL3 legano gli alleli HLA-C del gruppo 1, e il recettore inibitorio KIR2DL1 lega gli alleli HLA-C del gruppo 2. Di rilevanza per l’infezione da HCV è il fatto che la combinazione dei KIR2DL3 e HLA-C gruppo 1 è protettivo contro l’infezione cronica da virus C⁽²⁸⁻³⁰⁾. In più l’HLA-C può agire sulla maturazione delle cellule NK, in quanto durante lo sviluppo queste cellule interagiscono con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Così la presenza o l’assenza del legame con l’HLA-C può influenzare la risposta citochimica dell’espressione dei KIR da parte delle cellule NK e di conseguenza la risposta immunitaria antivirale⁽³¹⁻³³⁾.

La funzione delle cellule NK nell'infezione cronica da HCV può essere compromessa dal legame della proteina E2 di HCV con CD81, che ha funzione inibitoria sulle cellule NK⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Nell'infezione cronica di HCV c'è un'anormale interazione tra cellule NK e cellule dendritiche, e questo potrebbe essere un'anomalia della subpopolazione che esprime NKG2A. In più le cellule NK sono attivate dall'IFN- α e la produzione di questa citochina dalle cellule dendritiche plasmocitoidi è anomala in pazienti con epatite C cronica^(37,38). Le cellule CD56Bright sono aumentate negli individui HCV cronici confrontati con coloro che guariscono⁽³⁹⁾. Questi individui hanno una più alta frequenza di espressione di NKG2A/C e le cellule producono più IFN- γ .

La mancanza di informazioni che riguardano le cellule NK e l'infezione acuta da HCV sono lo scopo dell'attuale studio, per determinare se le NK si attivano durante la fase acuta e se i recettori di espressione potrebbero influenzare l'esito di malattia.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare la funzione ed il fenotipo delle cellule NK, nel sangue periferico di pazienti con epatite C, durante la fase acuta e confrontare gli individui che guariscono rispetto a coloro che cronicizzato durante il follow-up della malattia.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati studiati 22 pazienti, di cui

- 8 presentavano epatite acuta C che hanno eliminato con successo il virus,
- 14 pazienti con infezione acuta C in cui l'infezione ha cronicizzato,
- 17 controlli sani.

La diagnosi di infezione da epatite acuta C era basata sull'analisi di diversi criteri: documentata da seroconversione degli anticorpi anti-HCV tramite test RIBA, livelli di transaminasi almeno 10 volte maggiori rispetto ai limiti normali (50UI/ml), misurazione di HCV-RNA ed esclusione di altre possibili cause di epatiti acute (quali tossine, virus, alcool, autoimmunità e fattori metabolici).

Anticorpi monoclonali e citofluorimetria a flusso

Gli anticorpi monoclonali derivano da un unico clone plasmacellulare e oltre ad essere specifici per un singolo antigene sono identici nella struttura della regione costante e variabile. Sono uno strumento molto potente in biologia poiché in grado di legarsi con alta affinità a strutture proteiche specifiche e quindi permettono di individuare numerosi tipi di proteine a localizzazione sia membranaria che intracellulare. Per questo motivo gli anticorpi possono essere direttamente coniugati o con molecole fluorescenti di vario colore (FITC, PE, PerCP, APC, etc) o essere rilevati indirettamente utilizzando un anticorpo secondario specifico per l'anticorpo monoclonale utilizzato a sua volta coniugato ad un fluorocromo. I diversi fluorocromi sono eccitati da luce a diverse lunghezze d'onda ed emettono segnali anch'essi separabili in base alla lunghezza d'onda permettendo in tal modo di rilevare

(utilizzando un microscopio a fluorescenza o ancor meglio un citofluorimetro) più anticorpi contemporaneamente.

FLUOROCROMO	λ di eccitazione	λ di emissione
FITC (fluoresceina)	488 nm	500-537 nm
PE (ficoeritrina)	488 nm	550-595 nm
QR(quantum red)	488 nm	670 nm
PerCP (peridinina)	488 nm	675 nm
APC (alloficocianina)	647 nm	670-675 nm

In questo studio sono stati utilizzati anticorpi monoclonali diretti verso marcatori di membrana linfocitari e anticorpi per la valutazione intracellulare di diverse citochine tutti direttamente coniugati a diversi fluorocromi [CD56-FITC, CD3-PerCP, CD158b-FITC (KIR2DL2/2L3/2DS2), CD56-PE-Cy7, CD3 APC-Cy7 (Becton Dickinson), NKG2D-PE (R&D System), 3DL1-biotina e streptavidina-PerCP (Abcam), e CD158a-APC (KIR2DL1/2DS1, Beckman Coulter).

La citofluorimetria flusso (CFM) è una metodica che permette la misurazione e la caratterizzazione di sospensioni cellulari monodisperse basata sulla identificazione simultanea di alcune proprietà della cellula: dimensioni, architettura interna e presenza di uno o più marcatori fluorescenti, ad una velocità molto rapida, permettendo una analisi dettagliata.

In un citofluorimetro la sospensione cellulare monodispersa (cellule da sangue periferico, aspirato midollare, da tessuti solidi dissociati ecc.) viene convogliata in un sistema fluidico fino al punto di misura, dove incontra un fascio di luce focalizzata proveniente da una sorgente di eccitazione che può essere un laser o una lampada a vapori di mercurio (fig.3). L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula genera segnali (nel caso del FACSCalibur della Becton Dickinson un laser blu con λ di 488nm, e uno rosso di 635nm) che sono legati alle caratteristiche fisiche della particella

(diametro, volume, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di superficie) ed alla presenza di marcatori fluorescenti sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo della cellula. I segnali così emessi vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi semitrasparenti e filtri ottici, ed inviati ai relativi sensori (fotodiodi o fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, vengono digitalizzati, associati tra loro ed inviati ad un analizzatore - elaboratore, che provvede alla presentazione dei dati ed alla loro definizione statistica.

I moderni citofluorimetri a flusso possono facilmente discriminare 4 o 6 segnali fluorescenti di diverso colore, ciascuno legato ad un anticorpo o ad una sonda differente permettendo di analizzare simultaneamente l'espressione da parte di una cellula di molte combinazioni di antigeni diversi.

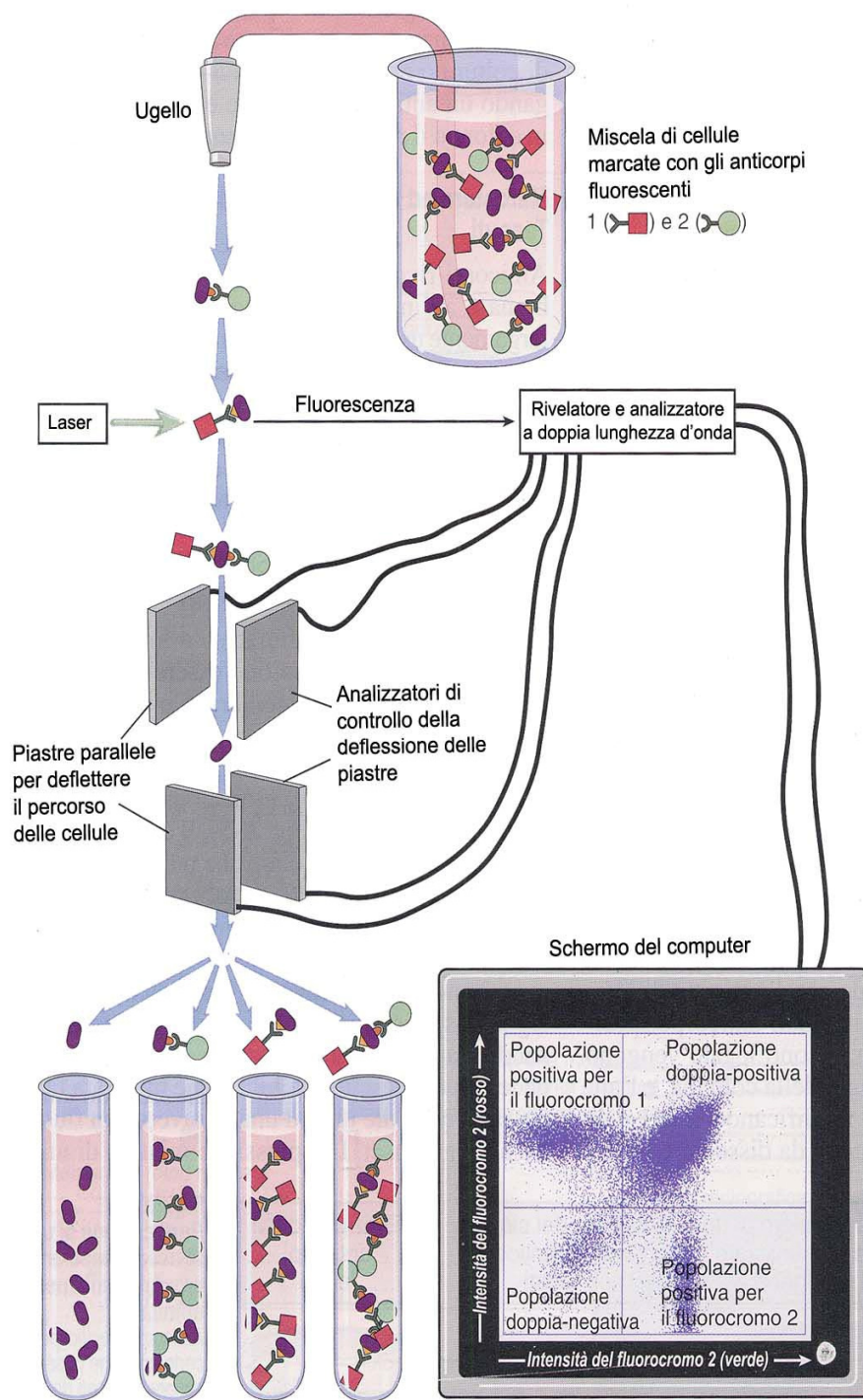


Figura 3 . Principio della citometria a flusso

Isolamento di cellule mononucleate (PBMC) dal sangue periferico

L'isolamento di PBMC dal sangue periferico è la metodica di partenza che permette di derivare linfociti T-CTL e linfociti T helper. Viene eseguita a partire da sangue fresco eparinato tramite centrifugazione su gradiente di densità sfruttando le caratteristiche di una soluzione di Ficoll-Paque in un rapporto pari a 1:1,33 di sangue. Le cellule così ottenute vengono risospese in terreno RPMI completato con beta-mercapto-etanolo 0.05mM, gentamicina finale 40µg/ml, fungizone 2.5µg/ml.

Per l'analisi fenotipica le cellule vengono marcate con anticorpo anti-CD127 coniugato con APC dopo incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti vengono lavate con PBS +0.5% FCS e poi marcate con il tetrametro per 20-30 minuti. Successivamente vengono lavate e in fine marcate con CD8 PerCP. Le cellule lavate un'ultima volta vengono analizzate al citofluorimetro.

Produzione di IFN- γ

Le PBMCs vengono incubate a 37 °C per 18 ore in presenza o assenza di interleuchina-12 (IL-12 Sigma-Aldrich); dopo l'incubazione viene aggiunta Brefeldina (10µg/mL) per 3 ore. Successivamente la superficie delle cellule NK viene marcata con l'anticorpo monoclonale CD3PerCP. Le cellule vengono poi fissate e permeabilizzate. Le cellule vengono marcate con IFN- γ PE e analizzate al citofluorimetro FACSCalibur. La proporzione di IFN- γ prodotto è calcolata sottraendo la percentuale di cellule IFN- γ positive nel campione non stimolato dal campione stimolato con IL-12.

Degranulazione

Le PBMCs sono incubate in presenza e in assenza di interleuchina-15 (1ng/mL, R&D System). Dopo 16 ore, alle cellule PBMC insieme alle cellule target K562 in rapporto 5:1 (E/T), sono aggiunti gli anticorpi CD107a o l'isotipo di controllo. Dopo un ora di incubazione, viene aggiunto il GolgiStop (BD Biosciences). Dopo 3 ore le cellule vengono lavate e marcate. La percentuale di degranulazione delle cellule NK è ottenuta sottraendo dal valore del CD107a l'isotipo di controllo.

Capacità litica

Le PBMCs vengono incubate tutta notte con o senza IL-15 (Sigma) alla concentrazione di 1ng/mL. Le cellule target (K562: 1×10^6) sono incubate con 100 μ Ci di Cromo⁵¹ a 37°C per 1 ora, lavate e messe in coltura per 4 ore in triplicati alla concentrazione di 3×10^3 con PBMC in un range che va da 20:1 a 5:1 di E/T ratio. L'efficienza di lisi è stata ottenuta dividendo il valore della percentuale di lisi sulla percentuale totale di cellule NK, ottenuta tramite analisi citofluorimetrica.

Analisi statistica

L'espressione delle cellule NK è confrontata con i test t-Student, Mann-Whitney, o Wilcoxon a seconda del più appropriato. Le correlazioni sono state fatte sull'analisi della regressione lineare, ed il coefficiente di correlazione Spearman. Le analisi seriali delle variazioni nelle cellule NK attraverso il follow-up sono state effettuate con il test ANOVA.

RISULTATI

Frequenza delle cellule NK in pazienti con infezione acuta da HCV

La frequenza delle cellule NK nella popolazione di PBMC è stata analizzata in 22 pazienti Caucasici con infezione acuta C con differente esito di malattia (14 cronici, 8 guariti) (Tabella 1) e 17 soggetti sani. I pazienti sono arruolati e studiati al momento della manifestazione clinica, in concomitanza degli elevati livelli di transaminasi (ALT), o 1-2 settimane dopo che le ALT erano già diminuite.

Le cellule NK sono identificate tramite citofluorimetro come CD56⁺CD3⁻, e suddivise nelle subpopolazioni CD56^{Bright} e CD56^{Dim} (Figura 1A). Gli individui con epatite acuta hanno una più bassa percentuale di NK totali rispetto ai controlli sani, ma la differenza è statisticamente significativa tra controlli e guariti ($9.2\% \pm 6.1\%$; vs $14.5\% \pm 5.8\%$; $p=0.05$) (Figura 1B). Nessuna differenza significativa è misurabile tra le due categorie di pazienti. Mentre la porzione di CD56^{Bright} è significativamente più alta sia nei pazienti che guariscono ($13.1\% \pm 16.5\%$) che in coloro che cronicizzano ($16.1\% \pm 12.0\%$) rispetto ai soggetti sani ($6.7\% \pm 4.1\%$; $p=0.006$ e $p=0.005$ rispettivamente). Durante la fase acuta, le cellule NK CD56^{Dim}, sono similmente ridotte nei pazienti rispetto ai controlli (Figura 1B). Così durante la fase acuta dell'infezione le cellule NK CD56^{Bright} e CD56^{Dim} sono alterate.

L'analisi seriale dei campioni durante la fase di convalescenza, mostra un declino delle cellule CD56^{Bright} nei pazienti che guariscono spontaneamente, evidenziabili già da 1-3 mesi dopo la fase acuta (da $13.1\% \pm 6.5\%$ a $6.0\% \pm 3.2\%$; $p=0.03$ t-Student; e $p=0.0062$ ANOVA). Questo declino precoce è evidente in pazienti con evoluzione cronica, i quali mostrano un drop transiente delle cellule NK CD56^{Bright} a 3-6 mesi che non sono mantenuti successivamente (Figura 1C). Alterazioni nella direzione opposta sono osservati sulle cellule NK CD56^{Dim} le quali aumentano progressivamente in coloro che guariscono, raggiungendo valori confrontabili a quelli dei controlli sani. Questo comportamento non è stato osservato nei pazienti con evoluzione cronica

perché la frequenza delle cellule NK CD56^{Dim} è ancora significativamente più bassa rispetto ai controlli sia a 1-3 che > di 6 mesi (Figura 1C).

Espressione recettori: NKG2D e KIR in fase acuta

L'attività delle cellule NK è strettamente regolata da numerosi recettori e segnali multipli che determinano l'attivazione finale delle NK. L'espressione del recettore di attivazione NKG2D è stata analizzata sulla superficie delle cellule NK nei pazienti che cronicizzano, che guariscono e nei controlli sani (Figura 2A). L'espressione del recettore NKG2D, durante la fase acuta, è più alta nei pazienti rispetto ai controlli sani, sia sulle NK totali che sui subset CD56^{Dim} e CD56^{Bright} (Figure 2B e 2C).

Sono stati studiati i livelli di espressione dei recettori inibitori KIR.

L'analisi è stata effettuata solo sulle cellule NK CD56^{Dim} perché le CD56^{Bright} non esprimono i KIR; anche perché la cellula NK dipende dalla presenza di un ligando HLA per l'attività inibitoria dei KIR, così abbiamo determinato il tipo di HLA-C negli individui con infezione da HCV (Tabella 1). Durante la fase acuta di malattia, nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata tra pazienti che cronicizzano e coloro che guariscono spontaneamente, anche quando vengono correlati all'HLA-C (Figura 2D).

Attività funzionale delle cellule NK

Per studiare ulteriormente il ruolo delle cellule NK durante la fase acuta di malattia, è stata accertata la capacità di queste cellule di produrre IFN- γ , una citochina coinvolta nel promuovere la risposta dell'immunità adattativa, e che gioca un ruolo nel controllo delle infezioni virali. La produzione di IFN- γ è stata valutata sulle cellule NK totali e sulle cellule NK CD56^{Bright} (Figura 3A). Durante la fase acuta di malattia vi è una più alta proporzione di cellule NK che producono IFN- γ sia nei pazienti che guariscono ($8.1\% \pm 7.8\%$), che in coloro che cronicizzano ($9.98\% \pm 8.3\%$) rispetto ai

controlli sani ($3.28\% \pm 2.29\%$; $p=0.026$ e $p=0.0033$ rispettivamente) (Figura 3B). Le differenze con i controlli sono più evidenti nei pazienti con evoluzione cronica, sebbene la produzione di IFN- γ non è statisticamente significativa tra le due categorie di pazienti. In linea con questo andamento, la proporzione di cellule NK CD56^{Bright} che producono IFN- γ è significativamente più alta in coloro che cronicizzato, rispetto ai controlli sani ($27\% \pm 19.6\%$ vs $15.4\% \pm 8\%$; $p=0.033$), ma non in coloro che guariscono ($14.9\% \pm 12.7\%$) (Figure 3B e 3C).

Nei pazienti con evoluzione cronica c'è un declino della produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK CD56^{Bright} durante il follow-up di infezione, ma questo non ha raggiunto un risultato statisticamente significativo (Figura 3C).

L'inibizione dei KIR, KIR2DL1, KIR2DL2 e KIR2DL3 sono importanti per determinare la capacità delle cellule NK a maturare e a produrre IFN- γ ⁽⁴⁰⁾.

Il subset di cellule NK che esprime HLA-C del gruppo 2 specifico per KIR2DL1/S1 o l'HLA-C del gruppo 1 specifico per KIR2DL2/L3/S2 mostra una proporzione maggiore di IFN- γ prodotto da entrambe le categorie di pazienti, in fase acuta, rispetto ai controlli sani. Coloro che guariscono spontaneamente ($12.2\% \pm 13.63\%$) e coloro che cronicizzano ($11.32\% \pm 12.11\%$) rispetto ai controlli sani ($2.1\% \pm 1.83\%$; $p=0.01$ e $p<0.01$ rispettivamente) per KIR2DL1/S1. Mentre per KIR2DL2/L3/S2 le percentuali sono: guariti ($15.6\% \pm 19.3\%$) pazienti cronici ($10.36\% \pm 9.45\%$) verso i controlli ($3\% \pm 4.7\%$), $p=0.01$ e $p<0.01$ rispettivamente (Figura 4B). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra le due categorie di pazienti per quanto riguarda la produzione di IFN- γ .

Attività citotossica delle cellule NK

La capacità delle cellule NK a degranulare e uccidere le cellule target è stata studiata grazie alla presenza della proteina CD107a sulla superficie delle cellule NK. Nei pazienti, durante la fase acuta

dell'infezione, si osserva un aumento di espressione di questa proteina rispetto ai controlli sani (Figura 5A). La differenza è statisticamente significativa per le cellule NK che esprimono KIR2DL2/L3 HLA-C gruppo 1 tra pazienti e controlli ($44.2\% \pm 13.8\%$ vs $29.9\% \pm 14.4\%$; $p=0.01$) (Figura 5B). Nei pazienti con infezione acuta c'è una più grande attivazione delle cellule NK KIR2DL2/L3 rispetto alle cellule NK KIR2DL1-positive ($44.2\% \pm 13.8\%$ vs $35.0\% \pm 20.9\%$; $p=0.005$ Wilcoxon) (Figura 5B). La degranulazione delle cellule NK KIR2DL2/3 sembra essere maggiore in coloro che guariscono rispetto a coloro che cronicizzano. Sebbene questa differenza non è significativa, solo le cellule NK KIR2DL2/3 di coloro che guariscono ($49.45\% \pm 12.25\%$) sono più attivate rispetto ai controlli ($30.69\% \pm 13.5\%$; $p=0.0053$) a differenza di coloro che cronicizzato ($40.69\% \pm 14.06\%$) (Figura 5B).

La funzione citotossica delle cellule NK è determinata dalla presenza o assenza di un ligando per i recettori inibitori KIR, ed il processo è chiamato "licensing"; la combinazione del KIR2DL3 con il proprio ligando HLA-C del gruppo 1 ha mostrato essere associata con la guarigione spontanea dall'infezione da HCV. Per questo motivo analizziamo le cellule NK KIR-positive raggruppando i pazienti sulla base di espressione dell'appropriato ligando HLA-C.

Sebbene vi sia un andamento di espressione del CD107a maggiore nei KIR-positivi di coloro che guariscono spontaneamente, questo non è statisticamente significativo (Figura 5C).

La capacità citotossica delle cellule NK è stata studiata con l'utilizzo del test del rilascio di cromo; le cellule sono state incubate overnight con o senza stimolo con IL-15 alla concentrazione di 1ng/ml. Le cellule Target utilizzate sono le K562 e sono state incubate a differenti rapporti con le cellule effettrici, in un intervallo che va da 20:1 a 5:1 (Figura 5C).

Sebbene le cellule NK dei pazienti con infezione acuta mostrano una capacità citotossica più grande rispetto ai controlli, una differenza statisticamente significativa è osservabile tra i controlli e la fase acuta di coloro che guariscono ($p= 0.05$) e tra i controlli e 1-3 mesi del follow-up di coloro che

cronicizzano ($p=0.002$) (Figure 5D e 5E). Queste differenze sono mantenute nelle prime fasi del follow-up dei cronici, ma non nei guariti, così che l'efficienza di uccidere è più grande negli individui che cronicizzano confrontata con coloro che guariscono durante il follow-up, con una differenza statisticamente significativa nei primi punti tempo (1-3 mesi del follow-up, $4.6\% \pm 0.7\%$ vs $2.5\% \pm 1.3\%$, $p=0.0055$ ad un E:T ratio di 20:1) (Figura 5E). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata nei diversi punti tempo con il test ANOVA in entrambi i gruppi di pazienti studiati.

E' stata studiata la correlazione tra i livelli di HCV-RNA e la funzione delle cellule NK durante la fase acuta di infezione da HCV in particolare sono state correlate tra viremia ed efficienza di lisi (ad un E/T ratio di 20:1) e viremia e percentuale di produzione di IFN- γ , ma non è stata osservata correlazione, suggerendo che i livelli di viremia non influenzano i livelli di attivazione della risposta dell'immunità innata sostenuta dalle cellule NK.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Diversi sono i meccanismi proposti per spiegare l'alta percentuale di pazienti con epatite cronica C. Studi in vitro, hanno suggerito una incapacità a promuovere l'immunità adattativa in seguito ad un difetto della risposta innata, mostrando l'interferenza dei prodotti genici di HCV con le funzioni antivirali del sistema dell'immunità innata, compresa l'inibizione dell'attività delle cellule NK da parte della proteina E2^(34,35,40).

Questa compromissione della risposta delle cellule NK potrebbe agire sul controllo iniziale dell'infezione, ma potrebbe anche influenzare il "priming" delle cellule T, impedendo l'interazione tra le cellule NK e le cellule dendritiche^(41,42). D'altra parte, i meccanismi che favoriscono il controllo virale nell'infezione da HCV sono ancora da chiarire. In questo contesto, l'espressione preferenziale dei recettori di inibizione KIR2DL3 sulle cellule NK, in coloro che guariscono potrebbe svolgere un ruolo^(29,30). In quanto KIR2DL3 ha un'affinità più bassa per il proprio ligando HLA-C rispetto agli altri KIRs, l'inibizione KIR2DL3-mediata delle cellule NK è intrinsecamente debole, questo potrebbe predisporre le cellule di questi individui ad essere più facilmente attivate dall'infezione virale, quindi proteggerli dalla persistenza virale^(29,30). L'impatto finale di questi meccanismi sulla funzione delle cellule NK, però è ancora da chiarire, perché non sono ancora stati fatti studi durante la fase acuta di HCV.

Abbiamo caratterizzato le cellule NK nella patogenesi da HCV; analizzato la frequenza, il fenotipo, e le proprietà funzionali delle cellule NK CD56⁺CD3⁻ e i loro subset CD56^{Dim} e CD56^{Bright}, studiandole longitudinalmente, in fase acuta, in pazienti che guariscono spontaneamente e in coloro che cronicizzato.

In conclusione possiamo affermare che le cellule NK dei pazienti con epatite C durante la fase acuta sono funzionalmente più attive delle cellule NK dei controlli sani. Questo

risultato è indicativo del fatto che i pazienti producono più IFN- γ , hanno una più forte attività citotossica e hanno una più grande attività a degranulare anche se questa differenza è più significativa per KIR2DL2/3. La funzione delle cellule NK è misurabile in entrambi i gruppi di pazienti, in coloro che cronicizzano e in coloro che guariscono, ed è più evidente nella fase iniziale dell'infezione (fase acuta e 1-3 mesi durante il follow-up). Le cellule NK CD56^{Bright} appaiono significativamente aumentate e le CD56^{Dim} sono ridotte nei pazienti in fase acuta rispetto ai controlli sani. Le cellule NK tendono a rimanere attivate più a lungo in coloro che cronicizzano rispetto a coloro che guariscono, ma questa attivazione sembra essere maggiore durante la fase acuta rispetto al follow-up. L'attività delle cellule NK è regolata da una complessa interazione di recettori di attivazione e recettori di inibizione. Per questo abbiamo osservato l'espressione del recettore NKG2D, il quale è conosciuto mediare l'attivazione delle cellule NK legando molecole MICA/B e ULBPs sulle cellule targets; e l'espressione dei recettori KIR2DL1 e KIR2DL2/3, i quali possono mediare l'inibizione delle cellule NK interagendo con i ligandi HLA-C⁴³.

In linea con i dati funzionali, il recettore di attivazione NKG2D è espresso a più alti livelli nei pazienti durante la fase acuta rispetto ai controlli sani in entrambi i subsets CD56^{Bright} e CD56^{Dim}.

Mentre l'espressione dei recettori di inibizione non è significativamente differente nelle diverse categorie di pazienti. Comunque una espressione preferenziale del CD107a è stata osservata sulle cellule NK KIR2DL2/3-positive rispetto ai KIR2DL1 durante la fase acuta d'infezione. Il KIR2DL3 e il gruppo 1 HLA-C è protettivo contro l'infezione cronica C^(29,30) come risultato probabile di più forti segnali inibitori generati dai KIR2DL1 e KIR2DL3, con un più debole rapporto di attivazione di cellule NK che esprimono KIR2DL1 confrontate con quelle che esprimono KIR2DL2⁽⁴⁴⁾. Nel nostro studio, comunque, abbiamo misurato una più alta attività di degranulazione nelle cellule

NK KIR2DL3-positive in coloro che guariscono rispetto a coloro che cronicizzano. La mancanza di una più forte associazione tra KIR2DL3 e guarigione potrebbe essere dovuta al numero limitato di pazienti studiati. In modo simile, abbiamo un potere limitato per misurare le differenze osservate per il test di citotossicità tra le categorie di pazienti, in quanto abbiamo la difficoltà ad avere un numero adeguato di campioni nel follow-up.

In conclusione, lo studio suggerisce un modello di incremento di attivazione di cellule NK durante la fase acuta, indipendentemente dall'esito di malattia, che si mantiene più a lungo in coloro che cronicizzano. Le cellule NK sembrano essere indotte in modo efficiente durante la fase acuta di HCV, in quanto la produzione di IFN- γ e la capacità litica è molto più forte nei pazienti durante la fase acuta di HCV rispetto ai controlli.

Comunque, il progressivo declino dell'attività delle cellule NK nei pazienti che cronicizzano non esclude la possibilità che la persistenza a lungo termine del virus da epatite C potrebbe eventualmente essere il risultato del bilanciamento tra i recettori di attivazione ed inibizione a favore di quelli a funzione inibitoria²⁹.

Le cellule NK non sono mai state studiate in fase acuta nelle infezioni virali, così non siamo in grado di definire se le nostre osservazioni sono specifiche per HCV. L'attivazione delle cellule NK durante la fase acuta dell'infezione da HCV, indica che gioca un ruolo nell'immunopatogenesi di HCV, e che ulteriori studi sono necessari per definire il loro specifico contributo nell'evoluzione di malattia.

Tabella 1

Paziente	Sesso	Età	ALT	Esito di malattia	HCV-RNA (copie/ml)	Genotipo	HLA-C
1	F	64	417	CRONICO	3100	2	1,2
2	M	29	875	CRONICO	12.987.741	2	2,2
3	M	29	245	CRONICO	16.242	3	2,2
4	M	44	852	CRONICO	451.916	1A	1,2
5	M	18	1114	CRONICO	6.775.737	3	1,1
6	M	67	490	CRONICO	10.170	2	1,1
7	F	33	35	CRONICO	<3200	1	ND
8	M	57	1027	CRONICO	1.344.724	2	1,2
9	M	25	146	CRONICO	528.241	1A/1B	1,2
10	M	22	358	CRONICO	ND	3	2,2
11	M	22	459	CRONICO	3807	3	1,1
12	F	41	225	CRONICO	1.361.225	1A	ND
13	M	39	210	CRONICO	3198	1B	ND
14	F	50	78	CRONICO	ND	2C	ND
1	F	50	567	GUARITO	5517	1	ND
2	F	52	67	GUARITO	1.030.000	1	1,2
3	M	20	1299	GUARITO	<3200	ND	1,2
4	M	28	152	GUARITO	4957	ND	1,2
5	M	18	54	GUARITO	12.991	4	1,2
6	M	27	54	GUARITO	ND	1	2,2
7	M	32	940	GUARITO	7355	2	1,1
8	F	25	1966	GUARITO	240.807	ND	1,2

ND non determinato

Figura 1

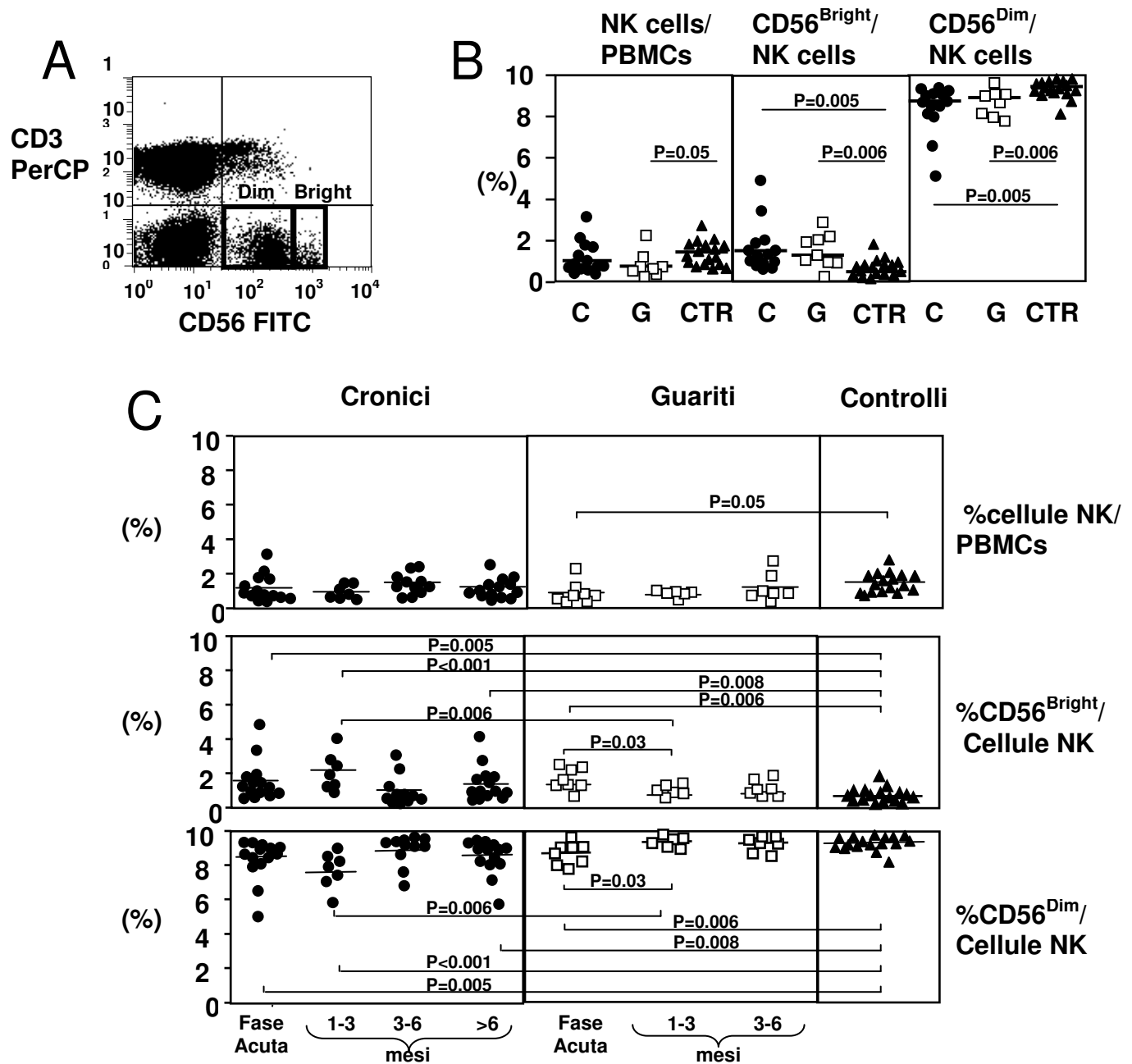


Figura 1. Modificazione dei subsets delle cellule NK durante la fase acuta dell'infezione di HCV. (A) Dot Plot rappresentativo della popolazione CD3-CD56Bright e CD3-CD56Dim. (B) Frequenza delle cellule NK rispetto ai linfociti totali, e frequenza delle CD56Bright e CD56Dim sulle cellule NK totali in 14 pazienti che cronicizzano (C, cerchio) 8 pazienti che guariscono spontaneamente (G, quadrato) e 17 controlli sani (CTR, triangolo). (C) Modificazioni delle cellule NK durante il follow-up. Il pannello in alto mostra la percentuale delle cellule NK rispetto ai linfociti T, i pannelli centrale e sottostante mostrano, rispettivamente, le percentuali relative alla porzione di CD56Bright e CD56Dim.

Figura 2

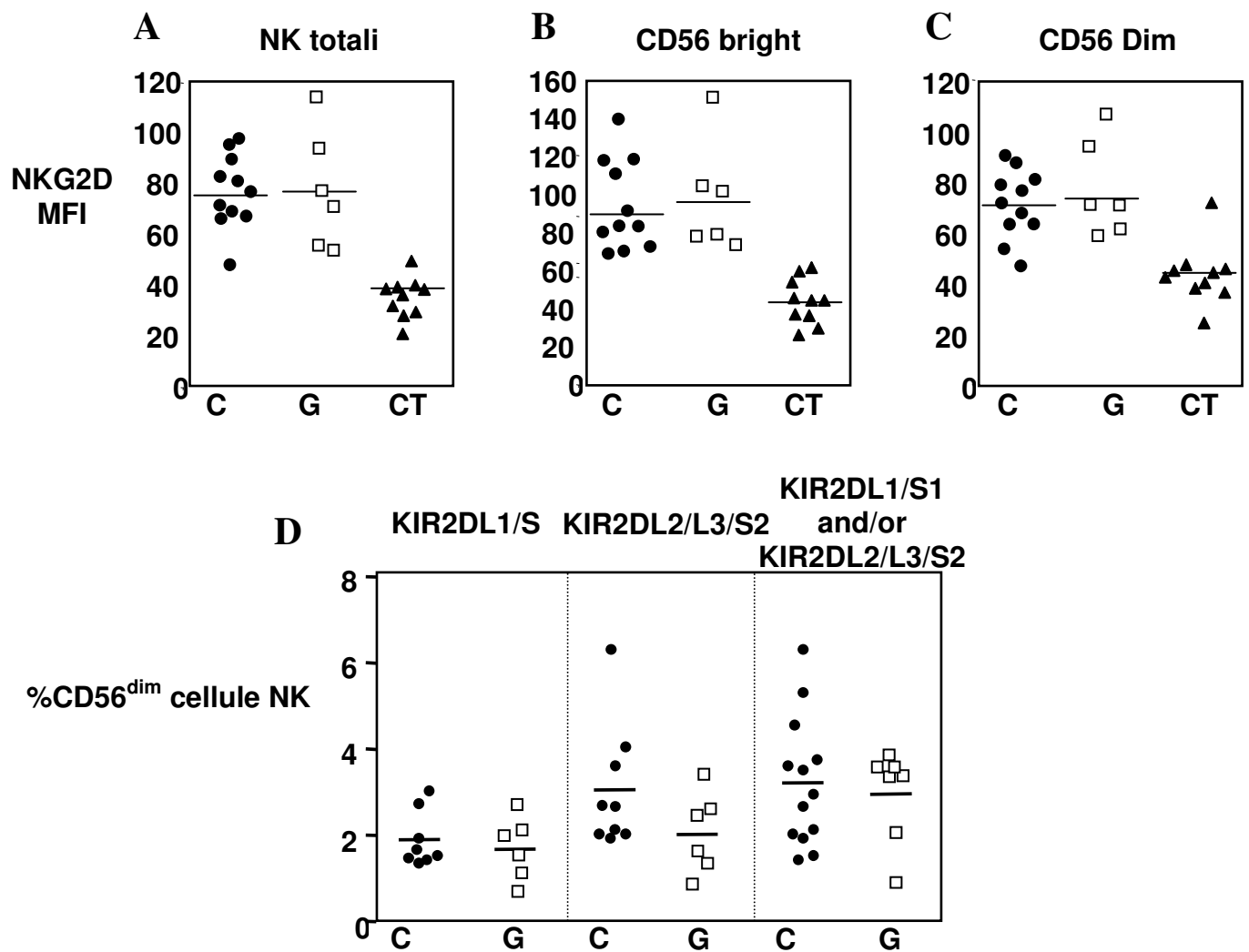


Figura 2. Recettore di espressione delle cellule NK in 3 differenti popolazioni. (A-C) Espressione di NKG2D su (A) NK totali, (B) CD56 Bright, (C) CD56Dim. L'espressione di questo recettore durante la fase acuta è confrontata in 11 pazienti con evoluzione cronica di malattia (C, cerchio), 6 pazienti che guariscono spontaneamente (G, quadrato) e 10 controlli sani (CTR, triangolo). (D) la percentuale di espressione delle cellule NK KIR-specifiche durante la fase acuta. La parte sinistra del pannello mostra la frequenza delle cellule NK KIR2DL1/S1 negli individui del gruppo 2 HLA-C, il centro del pannello mostra la frequenza delle cellule NK KIR2DL2/3/S2 negli individui del gruppo 1 HLA-C, e la destra del pannello mostra il numero totale di cellule NK che esprimono un KIR degli alleli HLA-C (o del gruppo1 HLA-C, o del gruppo 2 HLA-C, o entrambi).

Figura 3

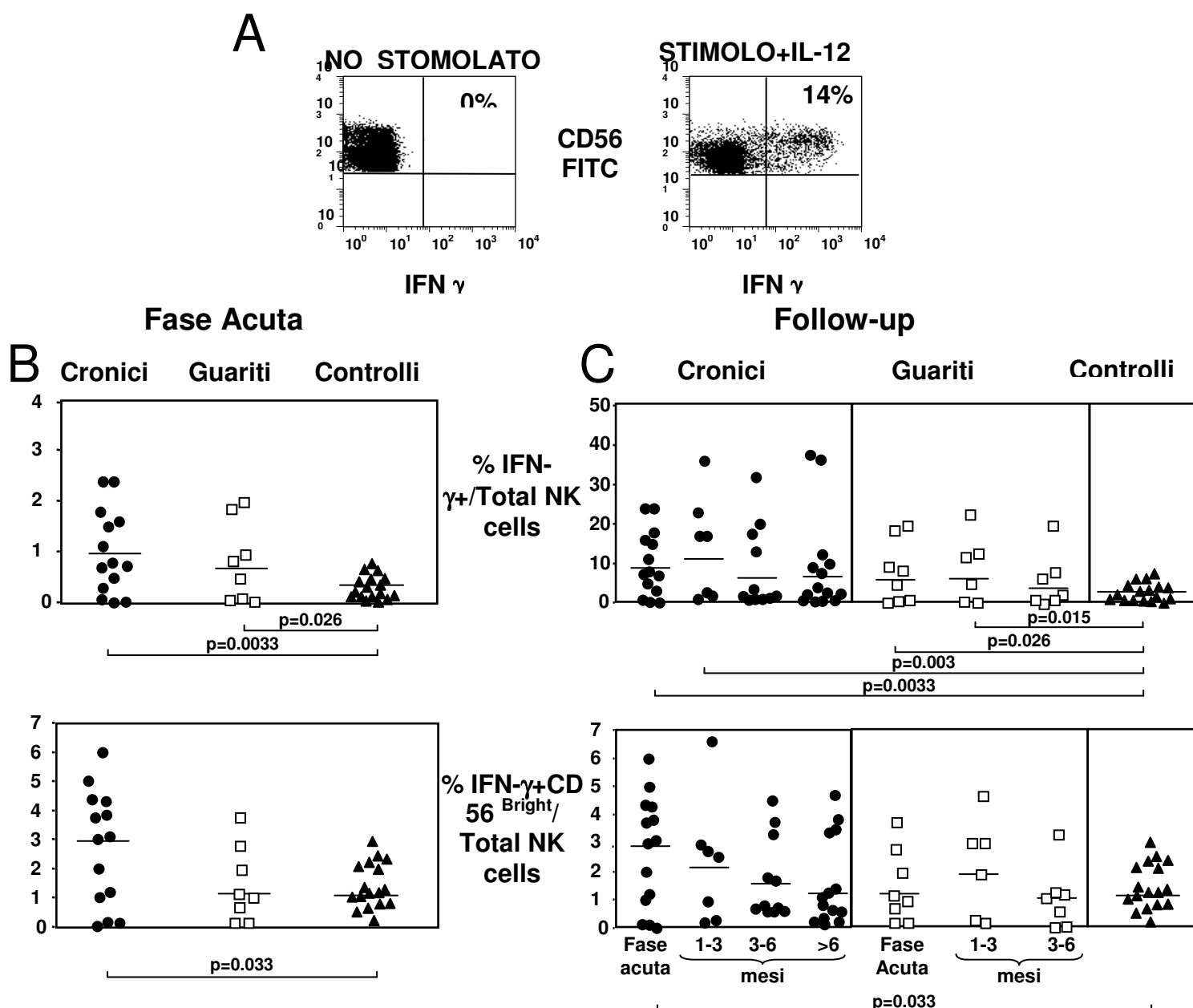


Figura 3. Aumento della produzione di IFN- γ sulle cellule NK. Le cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali per misurare la produzione di IFN- γ . (A) Dot plot rappresentativo delle produzione di IFN- γ in seguito ad incubazione notturna con e senza IL12. (B) Percentuale di IFN- γ positivo sulle cellule NK totali e percentuale di IFN- γ positivo sulle cellule NK CD56Bright durante la fase acuta della malattia (14 cronici, 8 guariti, 17 controlli sani). (C) Produzione di IFN- γ durante l'evolvere di malattia in pazienti cronici, guariti e controlli.

Figura 4

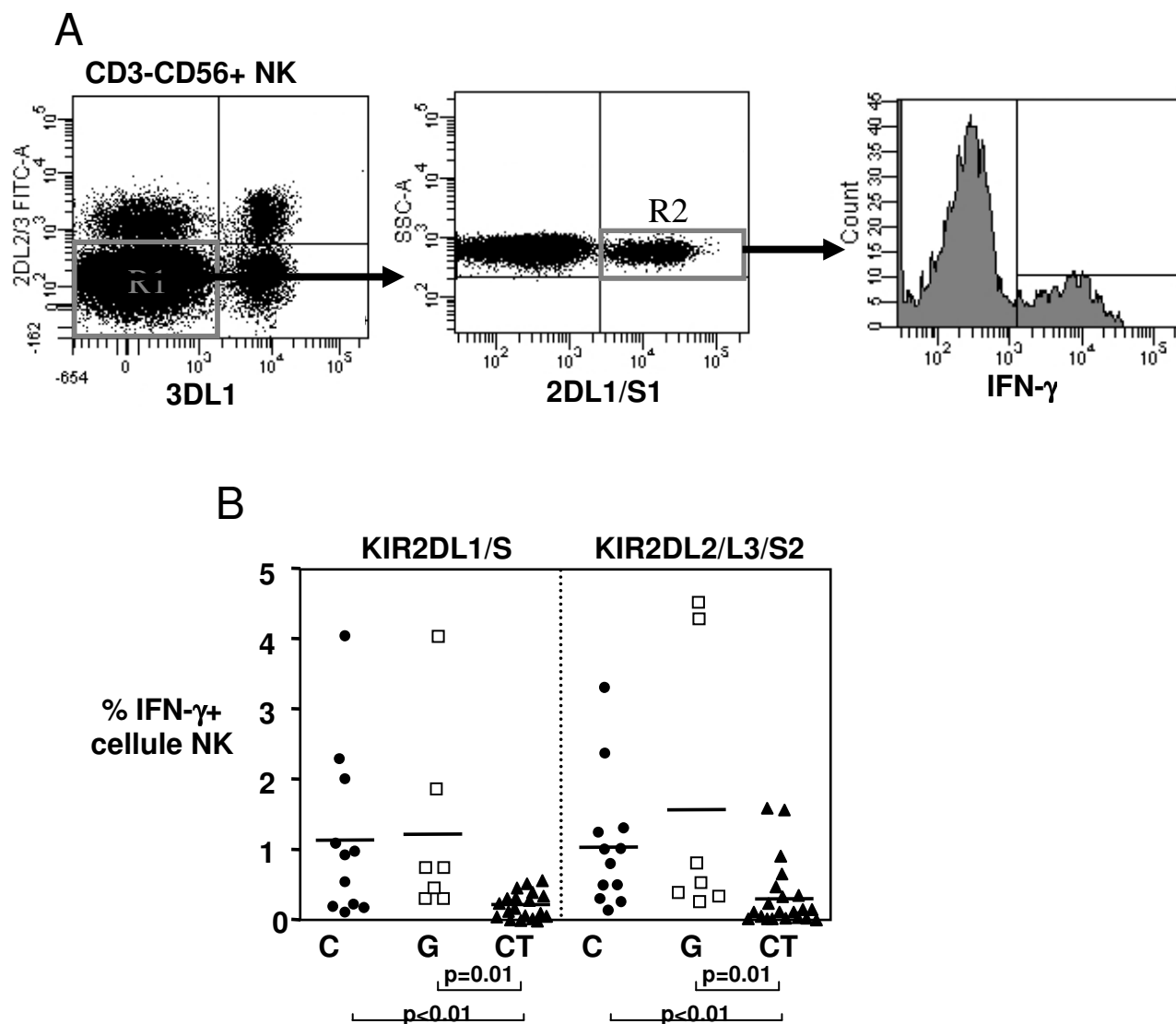


Figura 4. Attivazione delle cellule NK KIR-positive durante la fase acuta di malattia. (A) Dot plot rappresentativo, in cui è mostrata la strategia di analisi per ottenere cellule NK specifiche per un preciso KIR, in questo caso KIR2DL1/S1. Nel dot plot, le cellule NK CD3-CD56+ negative per KIR2DL2/L2/S2 e KIR2DL1 sono state analizzate per l'espressione di KIR2DL1/S1. L'istogramma mostra la produzione di IFN- γ delle cellule NK KIR2DL1/S1 positive. (B) Percentuale di produzione di IFN- γ di cellule positive per KIR2DL1/S1 o KIR2DL2/3/S2 durante la fase acuta di malattia nelle diverse categorie di pazienti e nei controlli sani. I cerchi rappresentano coloro che cronicizzato (n=12), i quadrati sono gli individui che guariscono (n=7) e i triangoli rappresentano i controlli sani (n=17).

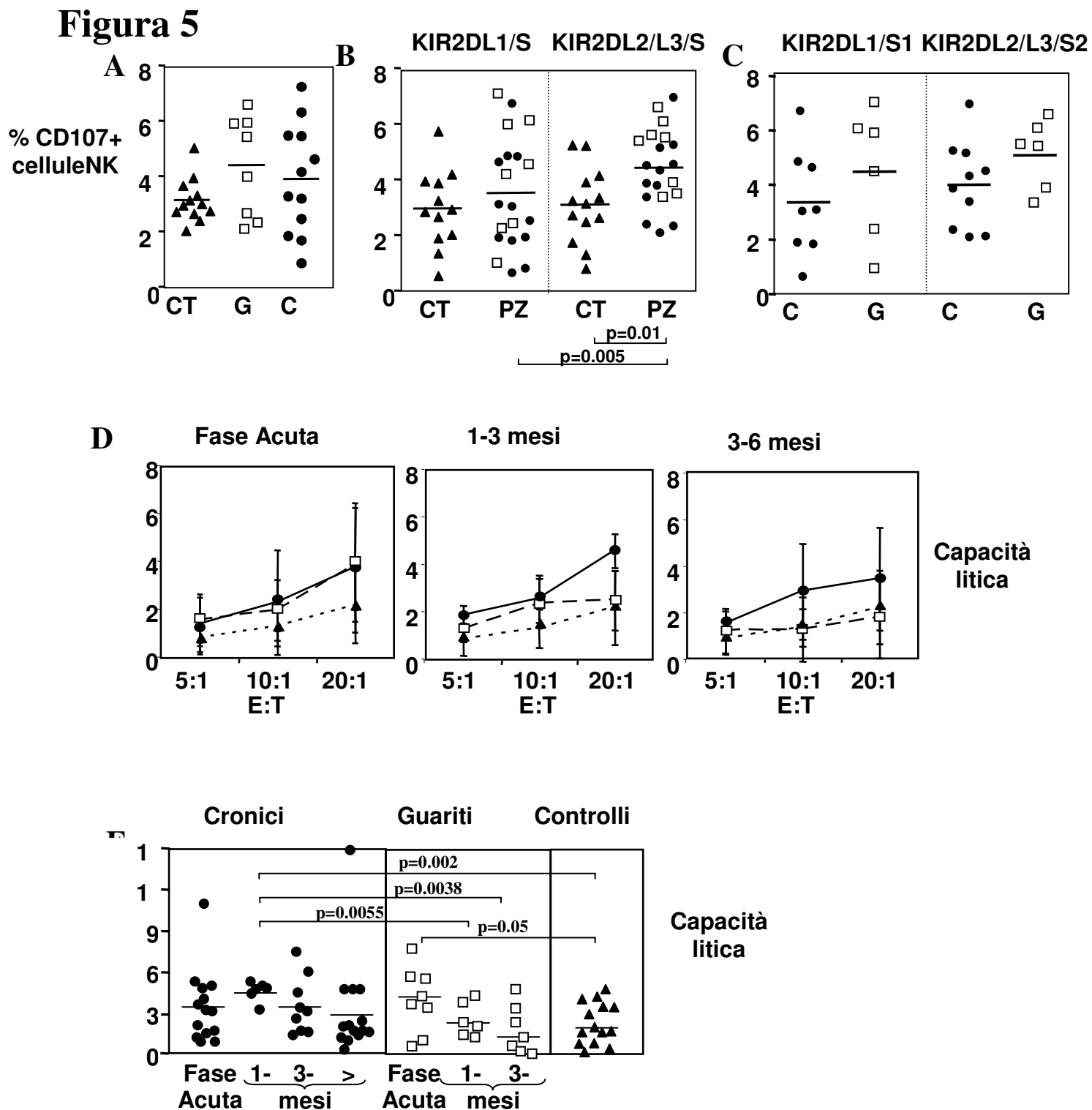


Figura 5. Degranulazione e capacità citotossica delle cellule NK durante la fase acuta d'infezione da HCV. (A) la percentuale di degranulazione delle cellule NK CD56Dim è stata analizzata durante la fase acuta in 12 pazienti cronici, 8 pazienti che guariscono e 12 controlli. Nessuna differenza, statisticamente significativa, è stata osservata. (B) Percentuale delle cellule NK positive per KIR2DL1/S1 o KIR2DL2/3/S che esprimono CD107 durante la fase acuta nei pazienti con epatite e nei controlli. I cerchi rappresentano gli individui con infezione cronica, i quadrati quelli che guariscono spontaneamente ed i triangoli i controlli sani. (C) Confronto di espressione del CD107a sulle cellule NK KIR2DL1/S1 o KIR2DL2/L3/S2 nelle due categorie di pazienti in rapporto al ligando HLA-C (rispettivamente gruppo 2 e gruppo 1). I pazienti con infezione cronica sono indicati con i cerchi mentre coloro che guariscono sono indicati con i quadrati. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata. (D) Attività citotossica normalizzata in fase acuta e follow-up, testata con rilascio di cromo contro le cellule target K562. I risultati mostrano i pazienti che cronicizzano (cerchio e linea piena), coloro che guariscono (quadrato e linea tratteggiata) e 12 controlli sani (triangolo e linea tratteggiata) a diversi rapporti tra le cellule effettrici e le cellule target. (E) Attività citotossica normalizzata a un E:T ratio di 20:1. Il numero dei pazienti e dei controlli è lo stesso di quello mostrato nella figura D.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferrari C, Urbani S, Penna A, Cavalli A, Valli A, La monaca V, Bretoni R, Boni C, Barbieri K, Uggeri J, Ficcadori F. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999. 31: 31-38.
2. Nelson, D.R., C.G. Marousis, G.L. Davis, M.R. Rice, J. Wong, M. Houghton, and J.Y.N. Lau. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J. Immunol.* 1997. 158: 1473-1481.
3. Wong, D.K.H., D.D. Dudley, N.H. Afdhal, J. Dienstag, C.M. Rice, L. Wang, M. Houghton B.D. Walker, and M.J. Koziel. Liver derived CTL in Hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J. Immunol.* 1998. 160: 1479-1488.
4. Barber D, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ and Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006. 439: 682-687.
5. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994. 76: 287-299.
6. Paul W and Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 1994. 76: 241-251.
7. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004. 40: 1062-1071.
8. Manigold T, Shin Ec, Mizukoshi E, Mihalik K, Murthy KK, Rice CM, Piccirillo CA, Rehermann B. Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood.* 2006. 107: 4424-32.
9. Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, and Ferrari C. Identification of immunodominant Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T cell

- epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 2001. 33.
10. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, Houghton M, and Walker BD. HLA class I restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus: identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokines release. *J. Clin Invest.* 1995. 96 :2311-2315
 11. Erickson AI, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL and Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001. 15:883-895.
 12. Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M, Pillay T, Ouchi K, Reyor LL, Zur Wiesch JS, Gandhi RT, Chung RT, Bhardwaj N, Klennerman P, Walker BD, Allen TM. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J. Exp. Med.* 2004. 200:1593-1604.
 13. Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feistone SM, Rehermann B. Kinetics of CD4+ and Cd8+ memory T cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. 2003. 77: 4781-4793.
 14. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev. Immunol.* 2004. 4:336-347.
 15. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family members leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 2000.192:1027-1034.

16. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003.170:1257-66.
17. Cai G, Karni A, Oliveira EM, Weiner HL, Haffer DA, Freeman GJ. PD-1 ligands, negative regulators for activation of naïve, memory, and recently activated human CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2004. 230:89-98.
18. Latchman YE, Liang SC, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004. 101:10691-10696.
19. Fuller MJ, Hildeman DA, Sabbaj S, Gaddis DE, Tebo TE, Shang L, Goepfert PA, and Zajac AJ. Cutting edge: emergence of CD127high functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. *J Immunol* 2005. 174:5926-5930.
20. Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, Wagner H and Busch DH. Selective expression of IL7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004. 101: 5610-5615.
21. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:215-29.
22. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999, 163: 2314-21.

23. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002, 195: 343-51.
24. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002, 195: 327-33.
25. Moretta A. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Current Opin Immunol* 2005, 17:306-311.
26. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005, 23: 225-74.
27. Colucci F, Di Santo JP, Leobson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 2002, 3:807-13.
28. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Rev Immunol* 2002; 20:217-251.
29. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP; et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305:872-874.
30. Romero V, Azocar J, Zuniga J, et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008; 45:2429-2436.
31. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006; 25:331-342.
32. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, Emerson SS, Shuhart MC, Gretch DR. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006, 43: 573-80.
33. Lin AW, Gonzales SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, Ha C, Jacobson IM, Talal AH. CD56(dim) and CD56(bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004, 137: 408-16.

34. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J exp Med* 2002, 195: 35-41.
35. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195:43-49.
36. Kronemberger B, Herrmann E, Hofmann WP, Wedemeyer H, Sester M, Mihm U, Ghaliai T, Zeuzem S, Sarrazin C. Dynamics of CD81 expression on lymphocyte subsets during interferon-alpha-based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Leukoc Biol* 2006, 80: 298-308.
37. Bonavita MS, Franco A, Paroli M, Santilio I, Benvenuto R, De Petrillo G, Levrero M, Perone A, Balsano C, Barnaba V. Normalization of depressed natural killer activity after interferon-alpha therapy is associated with a low frequency of relapse in patients with chronic hepatitis C. *Int J Tissue React* 1993, 15: 11-6.
38. Dolganiuc A, Chang S, Kodys K, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanism of reduced IFN.alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006;177:6758-6768.
39. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrant E, et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008;57:1121-1128.
40. Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, et al. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:217-227.
41. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004;173:6072-6081.

42. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T et al.. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2005;43:6758-6768.
43. Lanier LL.Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495-502.
44. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X et al. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008;118:1017-1026.