

La citofluorimetria a flusso nella caratterizzazione immunofenotipica dei linfociti in corso di Encefalite Autoimmune Sperimentale

Antonio Biffi, Guido Cavaletti, Roberta Rigolio

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche, Monza

e-mail: roberta.rigolio@gmail.com

L'Encefalite Autoimmune Sperimentale (EAS) è il principale modello animale impiegato nello studio dei meccanismi immunologici responsabili dello sviluppo della sclerosi multipla (SM). L'EAS viene generalmente indotta attivamente in diverse specie animali mediante la somministrazione di peptidi derivati da proteine espresse a livello del sistema nervoso centrale (SNC).

L'EAS indotta nel ratto di Lewis rappresenta un eccellente modello per lo studio dei meccanismi immunologici cellulo-mediati responsabili dell'insorgenza della fase acuta della SM nella quale si instaura uno stato di infiammazione a livello del SNC, che compromette la trasmissione efficace del segnale lungo le fibre mieliniche. La EAS ha un andamento monofasico ed è caratterizzata da un decorso ben definito, contraddistinto dall'insorgenza dei primi segni clinici dopo 10 giorni dall'induzione della patologia. L'acme del processo patologico si registra dopo 14 giorni. Istologicamente si osserva la presenza di infiltrati monocellulari perivascolari a livello del SNC, prevalentemente composti da linfociti CD4. Dopo 21 giorni dall'induzione, la malattia va incontro a remissione completa, e gli animali manifestano resistenza nei confronti di tentativi di reinduzione della malattia.

Diversamente dall'uomo, nel modello di Lewis sono stati identificati i principali clonotipi di linfociti T che svolgono un ruolo centrale sviluppo della patologia. Tra questi, il più studiato è il clonotipo di linfociti T CD4 che esprime la subunità beta (β) 8.2 nella porzione variabile (V) del recettore delle cellule T (TCR). La letteratura in merito è basata per lo più su dati di biologia molecolare o immunostochimica relativi alle cellule presenti nei linfonodi periferici o alle cellule infiltranti il SNC. Non sono attualmente presenti studi che caratterizzino la prevalenza dei linfociti TCR V β 8.2⁻ durante il decorso della EAS, soprattutto applicando metodiche relativamente veloci e accurate. Analogamente vi sono poche informazioni riguardo la cinetica e l'espressione delle molecole di adesione sulla superficie dei linfociti e responsabili dell'interazione con le pareti dei vasi e della migrazione nel parenchima tissutale. Di particolare rilievo per la extravasazione a livello del SNC sembra essere l'integrina alfa-4, riconosciuta da anticorpi diretti contro CD49d, che eterodimerizza con proteine della famiglia delle beta integrine (beta-1) originando moleco-

le responsabili dell'adesione stabile alle pareti dei vasi sanguigni (VLA-4). Anche in questo caso sono poche le informazioni circa la modulazione dell'espressione di alfa-4 sui linfociti durante il decorso della malattia. Solamente Selmaj et al.¹ hanno dimostrato un incremento nell'espressione di alfa-4 su splenociti di topo durante lo sviluppo dell'EAS indotta mediante trasferimento di cloni T encefalitogenici in topi sani.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di colmare, almeno in parte, le lacune concernenti la caratterizzazione del modello di EAS attivamente indotto nel ratto di Lewis. Ci siamo concentrati in particolare sulla frequenza dei linfociti T TCR V β 8.2⁺ e sull'espressione della molecola di adesione alfa-4 su splenociti derivati da animali sacrificati all'insorgenza e al picco di EAS, nonché sulle cellule ottenute dal midollo di animali al picco di malattia.

MATERIALI E METODI

Ratti Lewis femmina sono stati trattati mediante somministrazione subcutanea in entrambe le zampe posteriori di Proteina Basica della Mielina derivata da porcellino d'India (50 μ g totali) e risospesa in adiuvante completo di Freund. I controlli erano rappresentati da animali non trattati. Gli animali sono stati valutati giornalmente per l'insorgenza di segni clinici che sono stati classificati su una scala da 0 a 5 internazionalmente validata e applicata².

All'insorgenza dei sintomi (10 giorni post inoculo, p.i.) o al picco di malattia (14 giorni p.i.) gli animali sono stati sacrificati in accordo con la direttive 86/609 dell'Unione Europea e con il DL 116/1992.

La milza ed il midollo sono stati prelevati. Gli splenociti sono stati isolati dalla milza dopo trattamento meccanico della milza attraverso un filtro di acciaio con porosità di 200 mesh e successiva lisi degli eritrociti con una soluzione di cloruro d'ammonio (0.83% NH₄Cl, 2.059% Tris pH 7.65, pH finale 7.2) e lavate con PBS prima dell'incubazione con anticorpi. I leucociti infiltranti il midollo spinale sono stati ottenuti seguendo il protocollo descritto da McCombe et al.³

Le cellule vitali sono state identificate e contate mediante l'impiego del colorante vitale Trypan Blue.

Differenti quantità di cellule sono state quindi incubate per 40 minuti con una combinazione di anticorpi direttamente coniugati o coniugati con biotina e successiva-

mente incubate con streptavidina coniugata con PE-Cy7 come indicato in **Tabella 1**.

Mediante un FACSCanto (Becton Dickinson, San José, CA) sono stati acquisiti da 30,000 a 50,000 eventi nella regione dei linfociti. Le analisi sono state quindi condotte sulla popolazione di linfociti T identificata sulla base dei parametri fisici di FSC e SSC e per la contemporanea positività all'anticorpo diretto contro CD3. I dati riportati di seguito sono stati ottenuti utilizzando il software FACS Diva, mentre le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Si è scelto di utilizzare un One-Way ANOVA test (unitamente a Dunnet test come post-hoc test) per paragonare i risultati ottenuti dagli animali affetti da EAS e quelli dei controlli. Per comparare i risultati ottenuti dalle cellule della milza di animali EAS al picco di malattia e quelli ottenuti nella popolazione di cellule infiltranti il midollo spinale è stato invece utilizzato un Unpaired T-test.

RISULTATI

Cellularità e immunofenotipo delle cellule a livello della milza e del midollo spinale

La scelta di indagare la composizione cellulare della milza è stata dettata dal ruolo recentemente ribadito della milza nel controllo della proliferazione e dell'attivazione dei linfociti encefalitogenici nell'EAS^{4,5}. Abbiamo quindi studiato la cellularità della milza e il suo contenuto relativamente alla frequenza di cloni TCR V β 8.2+ e all'espressione di CD49d sui linfociti CD4 e CD8. Il numero di cellule estratte dalla milza diminuisce in maniera significativa negli animali al picco di malattia ($0.83 \pm 0.14 \cdot 10^8$ cells, $P < 0.01$ vs. controllo) rispetto ai controlli sani ($1.64 \pm 0.37 \cdot 10^8$ cells), mentre all'insorgenza dei segni clinici (10 gg) si osserva un incremento non significativo della cellularità ($1.92 \pm 0.39 \cdot 10^8$ cells) (Figura 1A). Tale diminuzione della cellularità non sembra dipendere da un incremento della mortalità delle cellule recuperate dalla milza così come evidenziato dalla colorazione in Trypan Blue (Figura 1B).

Gli splenociti sono stati quindi acquisiti mediante cito-

fluorimetro per effettuare una caratterizzazione immunofenotipica. A parità di eventi acquisiti nella regione dei linfociti, negli animali di controllo è presente una sola popolazione cellulare corrispondente ai linfociti, mentre negli animali affetti da EAS a 10 e 14 giorni l'analisi dei soli parametri fisici evidenzia la presenza di due popolazioni cellulari che presentano differenti valori di SSC. La caratterizzazione immunofenotipica ha indicato che entrambe le popolazioni erano costituite da leucociti, dal momento che risultano entrambe positive per CD45 ma, mentre la popolazione con SSC minore è composta da linfociti T e B (CD3+ e CD45RA+), la popolazione con elevati valori di SSC è composta da leucociti di natura non meglio definibile mediante gli anticorpi impiegati (Figura 1C). Per quanto riguarda il midollo, non siamo stati in grado di ottenere leucociti dal midollo spinale né nei controlli né negli animali con EAS fino al 14esimo giorno dall'induzione di malattia (Figura 1C).

Abbiamo quindi caratterizzato la popolazione di linfociti T sulla base dell'espressione di CD4 e CD8 (Figura 1D) sia nella milza che nel midollo spinale osservando un incremento significativo nella frequenza di cellule CD3+ CD4+ CD8- rispetto al controllo ($63.33 \pm 2.64\%$) solamente dopo 14 giorni dall'immunizzazione ($70.1 \pm 1.15\%$, $p = 0.02$) (Figura 1E), per i linfociti CD3+ CD8+ CD4- si osserva invece una diminuzione significativa solamente al picco di malattia (Figura 1F).

Il raffronto tra la prevalenza dei linfociti CD4 e CD8 a livello del midollo spinale chiaramente conferma che la EAS è una patologia in cui i linfociti CD4 svolgono una funzione chiave. Infatti se paragoniamo le frequenze dei CD4 e CD8 ottenuti dalla milza con quella delle medesime sottopopolazioni linfocitarie presenti nel midollo spinale al picco di malattia si osserva un significativo incremento della frequenza dei CD4 ($70.1 \pm 1.15\%$ vs. $81.34 \pm 5.80\%$ rispettivamente, $p = 0.018$) e un altrettanto significativa diminuzione dei linfociti CD8 ($22.33 \pm 1.76\%$ vs. $12.62 \pm 5.82\%$, $p = 0.034$) (Figura 1E ed F).

La prevalenza dei linfociti TCR V β 8.2+ a livello della milza e del midollo spinale

Non si osserva alcuna variazione nella frequenza dei

Tabella 1

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Fornitore
Mouse anti CD3	G4.18	FITC	BD
Mouse anti CD4	OX-35	R-PE	BD
Mouse anti CD8	OX-8	R-PE	BD
Mouse anti TCR $\alpha\beta$	R73	PerCP	BD
Mouse anti CD4	W3/25	Biotin	Biologend
Mouse anti CD8	MRC OX-8	Biotin	Abcam
Mouse anti CD45	MRC OX-1	FITC	Cymbus Biotechnology
Mouse anti	TCR V β 8.2 R78	Alexa Fluor® 647	Biologend
Mouse anti CD49d	MR α 4-1	Alexa Fluor® 647	Biologend
Streptavidin		PE-Cy7	Biologend

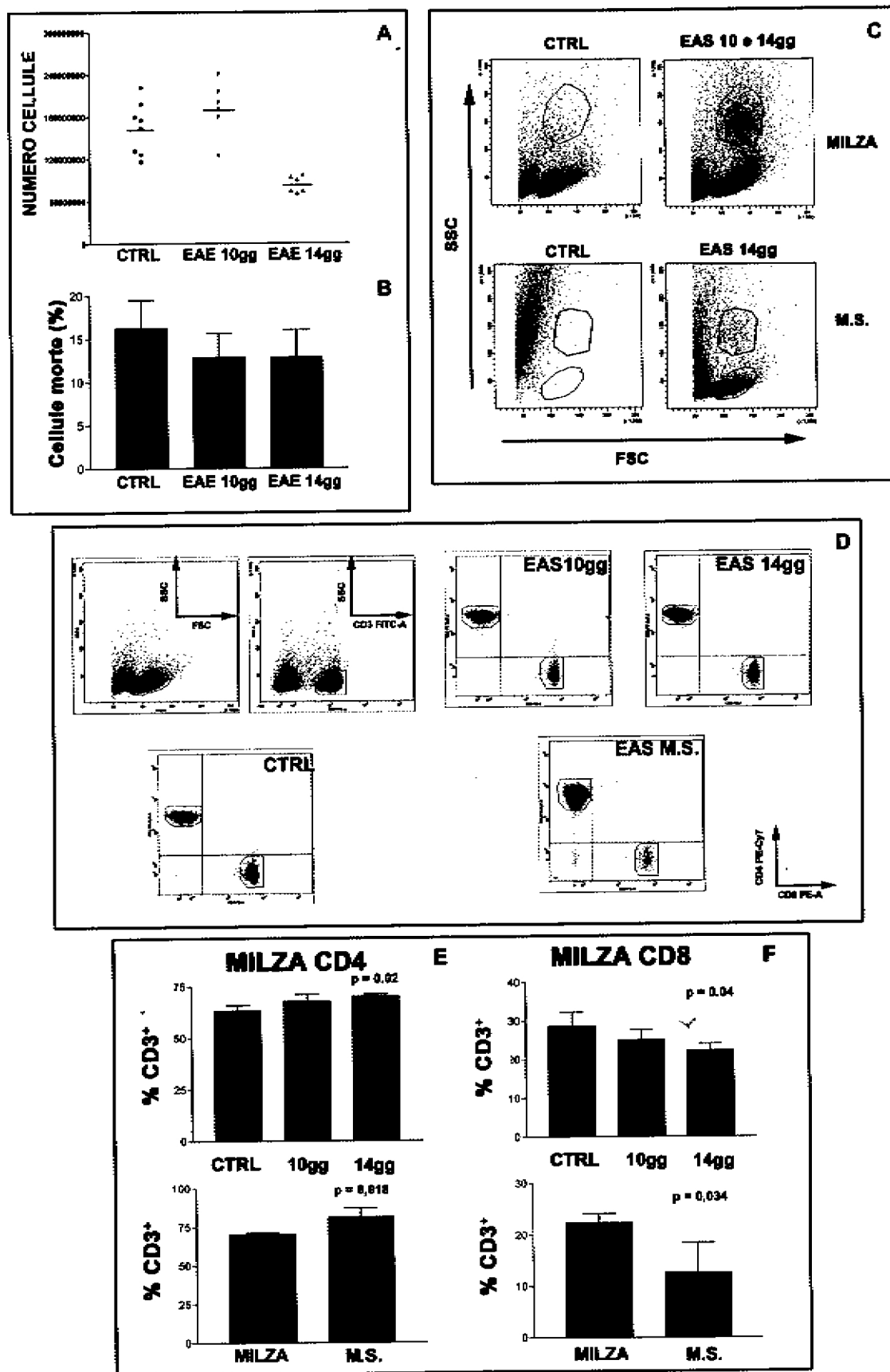


Fig. 1 Analisi della cellularità nella milza e nel m.s. I ratti sono stati sacrificati all'insorgenza dell'EAS (10gg) e al picco di malattia (14gg). I controlli sono rappresentati da animali non somministrati. La milza è stata asportata e gli splenociti ottenuti per disaggregazione meccanica. Conta degli splenociti **A**) negativi (vitali) e **B**) positivi (non vitali) per la colorazione Trypan blue. **C**) Gli splenociti e le cellule recuperate dal midollo sono stati acquisiti mediante FACSCanto o **D**) marcati con anticorpi per CD3, CD4 e CD8. Le cellule presenti nella regione corrispondente ai linfociti e contemporaneamente esprimenti CD3 sono state analizzate per l'espressione di CD8 (asse X) e CD4 (asse Y). **E** ed **F**) I risultati sono forniti come percentuale di cellule CD3⁺CD4⁺CD8⁻ o CD3⁺CD8⁺CD4⁻ rispetto alle cellule CD3⁺. I risultati sono stati espressi come media e d.s. e calcolati su almeno 3 animali per gruppo. Ctrl= controlli, 10 e 14gg= 10 e 14gg p.i.

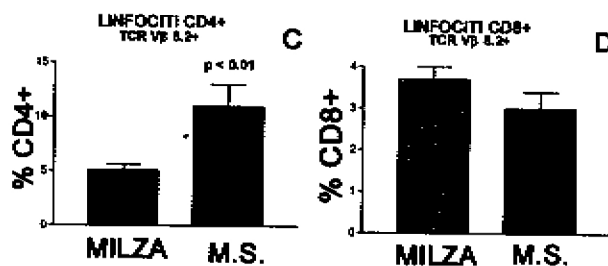
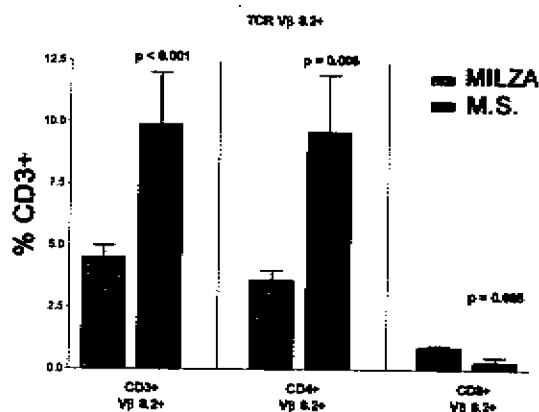
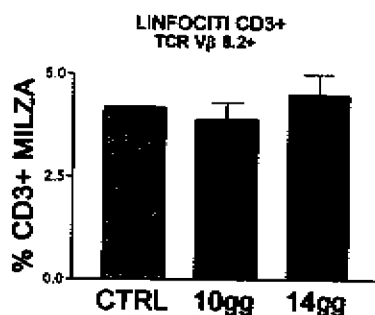
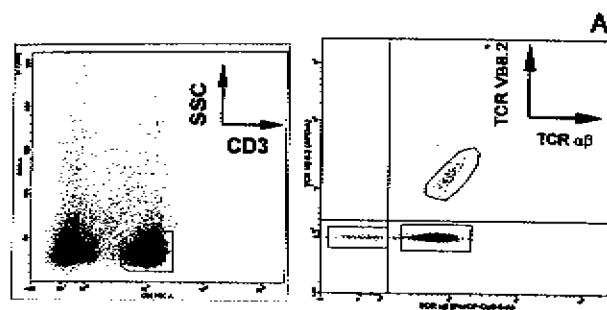


Fig. 2. Prevalenza dei linfociti T esprimenti TCR V β 8.2. Gli splenociti e le cellule estratte dal m.s. sono stati marcati con una combinazione di anticorpi in grado di riconoscere CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ e TCR V β 8.2. Le cellule contemporaneamente presenti nella regione linfocitaria e positive per CD3 e CD4 o CD8 sono poi state analizzate per l'espressione del TCR $\alpha\beta$ e del TCR V β 8.2 (A) riportante in ascissa il segnale derivante dall'anticorpo per il TCR $\alpha\beta$ ed in ordinata quello per il TCR V β 8.2. I linfociti esprimenti il TCR V β 8.2 sono rappresentati quale percentuale della popolazione di linfociti CD3⁺. Paragone tra la percentuale di linfociti CD3⁺ TCR V β 8.2⁺, o CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺ nella milza e nel midollo 14gg p.i. considerando come riferimento la popolazione (B) CD3⁺ o le popolazioni di linfociti CD4 (C) e CD8 (D). I risultati sono stati espressi come media e d.s. e calcolati su almeno 3 animali per gruppo. M.S. = Midollo Spinale. Ctrl= controllo, 10 e 14gg= 10 e 14gg p.i., M.S.= midollo spinale.

cloni TCR V β 8.2⁺ durante il decorso della malattia a livello della milza (Figura 2A), mentre il raffronto con i

linfociti infiltranti il midollo spinale indica un incremento significativo della loro presenza (Figura 2B).

I cloni CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ TCR V β 8.2⁺ rappresentano la maggioranza dei linfociti TCR V β 8.2⁺ presenti nel midollo. Tuttavia essi non rappresentano la maggioranza assoluta dei cloni CD4 presenti nel midollo all'acme di malattia, nonostante il loro incremento sia significativo all'interno della popolazione dei CD4 rispetto alla situazione osservata nella milza. I cloni CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻ TCR V β 8.2⁺ contribuiscono in maniera marginale alla popolazione di TCR V β 8.2⁺ infiltranti (Figura 2C e D).

L'espressione di CD49d a livello della milza e del midollo spinale

Abbiamo inizialmente valutato la presenza di CD49d sulla superficie dei linfociti CD4 e CD8 sulla base delle variazioni dell'intensità di fluorescenza del segnale generato dall'anticorpo specifico diretto contro CD49d. Come riportato in figura 3A, la fluorescenza relativa a CD49d non varia per i linfociti T CD4 e CD8 ottenuti dalla milza. Tuttavia l'espressione di tale molecole aumenta nelle cellule presenti nel midollo spinale all'acme di malattia. Tale incremento riguarda prevalentemente i CD4⁺ (fluorescenza media 424.3 \pm 41.4 nella milza vs. 1464.80 \pm 76.50 nel midollo, p < 0.0001) e in misura minore i linfociti CD3⁺ CD8⁺ T cells (fluorescenza media 384.0 \pm 45.60 nella milza vs. 736.40 \pm 74.60, nel midollo, p = 0.0003, Figura 3B).

Abbiamo anche normalizzato l'intensità di fluorescenza media nei campioni marcati con CD49d con quella della loro controparte non marcata. Anche in questo caso è risultato evidente un incremento maggiore nel caso dei linfociti CD4 rispetto ai CD8⁺.

DISCUSSIONE

L'EAS indotta attivamente nel ratto di Lewis rappresenta un modello di malattia estremamente valido per studiare le cellule coinvolte nella eziopatogenesi del fenomeno autoimmune. Tuttavia gli strumenti sinora impiegati (biologia molecolare e immunocistochemica) non permettono una più approfondita caratterizzazione delle cellule infiltranti il SNC o presenti negli organi linfoidi secondari. Per tali ragioni abbiamo deciso di impiegare la citometria a flusso, una metodica capace di descrivere più precisamente l'immunofenotipo delle popolazioni analizzate, ed in tempi relativamente più brevi rispetto alle tecniche di biologia molecolare.

In tal modo abbiamo potuto identificare molteplici popolazioni cellulari nella milza all'esordio ed al picco di malattia. Unitamente ad una diminuzione delle cellule recuperate dall'organo stesso, tali dati suggeriscono una influenza esercitata dal depauperamento corporeo legato al progredire della patologia o all'influenza del sistema endocrino sulle popolazioni leucocitarie⁶⁻⁹.

Abbiamo altresì dimostrato la presenza di una popolazione alternativa a quella linfocitaria sia nella milza che nel midollo. In considerazione dei soli parametri fisici possia-

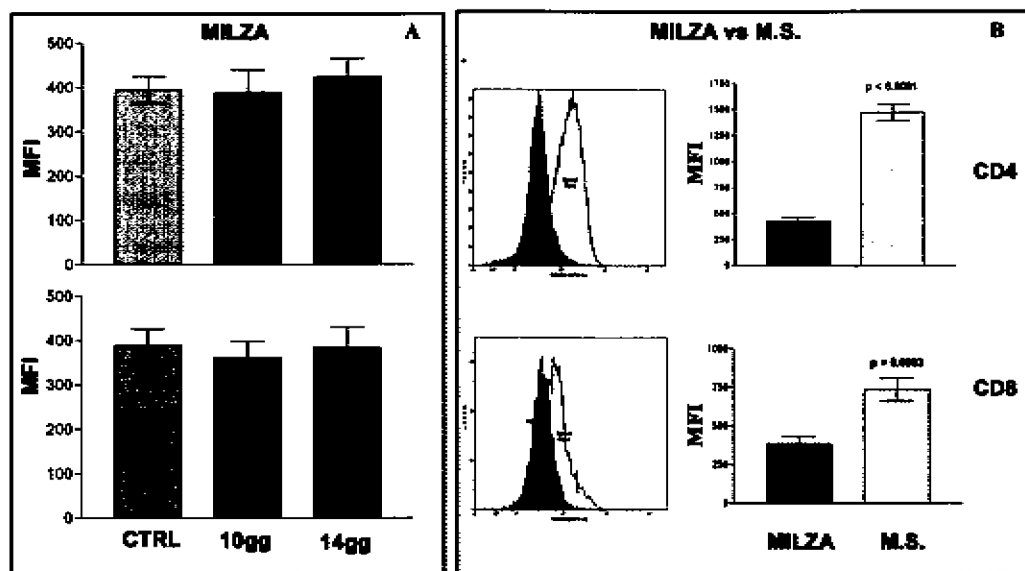


Fig. 3 Espressione di CD49d sui linfociti CD4 e CD8. Le cellule sono state isolate dalla milza e dal midollo e di seguito incubate con anticorpi in grado di identificare le cellule CD3⁺ e CD4⁺ o CD8⁺ nonché la presenza di CD49d. I valori di fluorescenza di CD49d sono stati valutati considerando la fluorescenza media calcolata sul almeno il 95% della popolazione di linfociti CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺. I dati riportati nei grafici si riferiscono alla media e deviazione standard calcolati su almeno 3 animali nella milza (A). Le stesse analisi sono state compiute anche per le cellule derivanti dal m.s. e paragonati con quelli ottenuti da splenociti di animali 14gg p.i. (B). Ctrl= control, 10 e 14gg= 10 e 14gg p.i., M.S.= midollo spinale. MFI: Intensità media di fluorescenza.

mo ipotizzare che tale sottopopolazione sia composta granulociti, stimolati dalla presenza nell'adiuvante di strutture di origine batterica.

Il nostro lavoro suggerisce inoltre che le cellule infiltranti il midollo spinale non si sviluppino nella milza all'instaurarsi della malattia per poi migrare nel midollo spinale, ma più presumibilmente esse proliferano a livello del sistema nervoso centrale¹⁰. Inoltre, diversamente da quanto affermato da Selmaj et al.¹ le molecole responsabili dell'adesione dei linfociti alla parete dei vasi non sembrano essere upregolate, se non a livello dell'organo bersaglio.

La citometria a flusso si è quindi rivelata un ottimo strumento per l'analisi delle popolazioni cellulari coinvolte nello sviluppo della EAS nel ratto di Lewis, fornendo altresì spunti per approfondire l'analisi in futuro, investigando ulteriori markers da utilizzare in prospettiva nel corso della validazione di terapie per la SM.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa S. Galbiati per il contributo scientifico al disegno sperimentale, la Dott.ssa K. Pilkington per i preziosi consigli sulla preparazione degli splenociti, la Dott.ssa A. Canta, Dott.ssa G. Nicolini and Dott.ssa V. Carozzi per l'aiuto nel trattamento degli animali.

Gli esperimenti sono in parte stati sostenuti dal MIUR 2006 (prot. 2006064219 002).

BIBLIOGRAFIA

- Selmaj K, Walczak A, Mycko M, Berkowicz T, Kohno T, Raine CS. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding protein (TNFbp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur J Immunol.* 1998;28(6):2035-44
- Matthaei I, Polman CH, de Groot CJ, Dijkstra CD, Koetsier JC, Sminia T. Observer agreement in the assessment of clinical signs in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1989;23(1):25-8

3. McCombe PA, Harness J, Pender MP. Effects of cyclosporin A treatment on clinical course and inflammatory cell apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basic protein. *J Neuroimmunol.* 1999;97(1-2):60-9

- Dietlin TA, Hofman FM, Gilmore W, Stohlman SA, van der Veen RC. T cell expansion is regulated by activated Gr-1+ splenocytes. *Cell Immunol.* 2005;235(1):39-45
- Tischner D, Weishaupt A, van den Brandt J, Müller N, Beyersdorf N, Ip CW, Toyka KV, Hünig T, Gold R, Kerkau T, Reichardt HM. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 2006;129(Pt 10):2635-47
- Mackenzie FJ, Leonard JP, Cuzner ML. Changes in lymphocyte beta-adrenergic receptor density and noradrenaline content of the spleen are early indicators of immune reactivity in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol.* 1989;23(2):93-100
- De Vos AF, van Riel DA, van Meurs M, Brok HP, Boon L, Hintzen RQ, Claassen E, Hart BA, Laman JD. Severe T-cell depletion from the PALS leads to altered spleen composition in common marmosets with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Neuroimmunol.* 2005;161(1-2):29-39.
- Leonard JP, MacKenzie FJ, Patel HA, Cuzner ML. Hypothalamic noradrenergic pathways exert an influence on neuroendocrine and clinical status in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 1991;5(4):328-38
- Staber FG, Johnson GR. The responses of hemopoietic precursor cells in mice to bacterial cell-wall components. *J Cell Physiol.* 1980;105(1):143-52
- Muhalab S, Lidman O, Weissert R, Olsson T, Svenningsson A. Intra-CNS activation by antigen-specific T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2001;113(2):202-11
- Rigolio R, Biffi A, Oggioni N, Cavaletti G. Actively induced EAE in Lewis rat: characterization of spleen and spinal cord infiltrating lymphocytes by flow cytometry during the course of the disease. *J Neuroimm.* 2008; 199 (1-2):67-74.