Relazione scientifica sull'attività svolta dalla dott.ssa Francesca Di Rosa presso il laboratorio del prof. Adrian Hayday, The Francis Crick Institute, Londra, Gran Bretagna (dal 5 al 23 febbraio 2018)

PROGRAMMA DI RICERCA STM dal titolo

"Interazione tra linfociti T γδ e linfociti T CD8 nel midollo osseo"

Nel corso della mia permanenza presso il Francis Crick Institute nel mese di febbraio 2018, ho svolto degli esperimenti sulle popolazioni T linfocitarie del midollo osseo, utilizzando topi geneticamente modificati disponibili presso l'Istituto. In particolare, ho studiato il fenotipo di linfociti T CD4, CD8 e T γδ in topi femmina dei seguenti ceppi:

- Ceppo wild-type (wt) C57BL6/J
- Ceppo wild-type (wt) FVB
- Ceppo TCRδ ko in background FVB

La scelta di questi ceppi e di individui femmina è stata determinata dalla disponibilità. In particolare, la colonia di topi TCRδ ko è stata espansa in background FVB dall'equipe del prof. Hayday presso la Yale University prima, e il Francis Crick Institute poi. Invece i topi TCRδ ko hanno mostrato difficoltà nella riproduzione in background C57BL6/J.

Il primo passo del mio progetto è stato quello di valutare le percentuali di linfociti T nella milza di topi wt e topi TCRδ ko, entrambi di background FVB. I risultati hanno mostrato i seguenti valori delle percentuali di linfociti T CD4, T CD8 e T γδ nella milza (media di 3-4 topi; deviazione standard in parentesi)

	T CD4	T CD8	T γδ
FVB wt, 4 topi	30,9 (5,1)	9,9 (1,1)	0,5 (0,1)
FVB TCRδ ko, 3 topi	32,5 (4,1)	8,9 (1,8)	0,0 (0,0)

In aggiunta, ho esaminato topi di ceppo C57BL6/J wt, che avevo usato in mie pubblicazioni precedenti sui linfociti T CD8 di midollo osseo (Parretta E et al J Immunol, 2005; Cassese G et al Blood, 2007). Ho trovato le seguenti percentuali di linfociti T nella milza: T CD4 20,5%; T CD8 13,7 %; T γδ 0,8%.
Come si vede dalla tabella i miei risultati hanno mostrato che le percentuali di linfociti T CD4 e CD8 nella milza sono simili in topi wt e TCRδ ko. Questi risultati sono in accordo con la precedente letteratura che ha mostrato che i topi TCRδ ko hanno dei difetti a livello delle barriere epitaliali (Girardi M et al J Invest Dermatol, 2006), ma non mostrano immuno-deficienze grossolane negli organi linfoidi secondari.

Sono passata quindi al cuore del mio progetto, ossia l'analisi dei linfociti T CD8 di midollo osseo, che ho effettuato in topi femmina wt e TCRδ ko, entrambi in background FVB. La scelta di individui femmina è stata determinata dalla disponibilità. Utilizzando la citofluorimetria multidimensionale, grazie alla piattaforma disponibile presso l'istituto ospitante, ho studiato il fenotipo dei linfociti T CD8 di midollo osseo. I marcatori di membrana su cui ho concentrato la mia attenzione sono: CD44, recettore per acido ialuronico, la cui espressione è più elevata nei linfociti della memoria; CD62L, molecola d'adesione che regola la migrazione leucocitaria ai linfonodi, CD122, la catena beta del recettore dell'IL-2/IL-15. Come si osserva nella figura, non c'è sostanziale differenza nei profili di espressione di questi marcatori nei linfociti T CD8 di midollo osseo ottenuti da topi wt e da topi TCRδ ko.

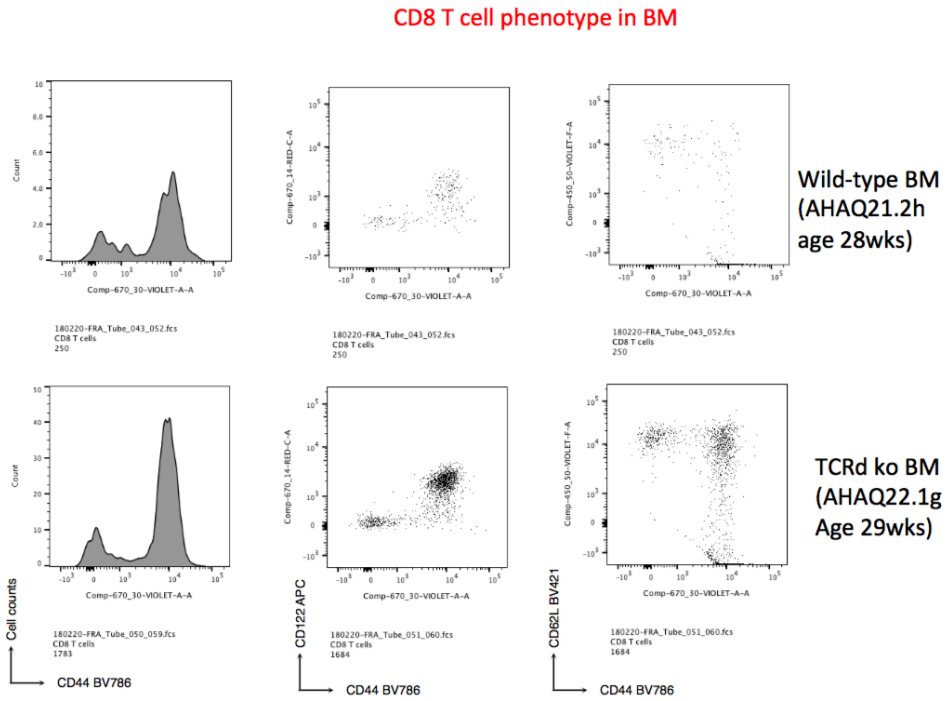

Figura
Profili di analisi citofluorimetrica di linfociti T CD8 ottenuti dal midollo osseo di topi wt e topi TCRδ ko. Cellule di midollo osseo sono state colorate con anticorpi monoclonali specifici per CD3, CD8, CD44, CD62L, CD122, coniugati con fluorocromi diversi, come indicato nella figura. Dopo 2 lavaggi con PBS BSA 0,5% EDTA 2 mM, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro BD Fortessa equipaggiato con 4 laser. L'analisi è stata effettuata mediante software FlowJo, v 10.4. In questa figura l'analisi è stata ristretta ai linfociti vivi CD3+ CD8+ e condotta su circa 250 cellule nel topo wt e 1700 cellule nel topo TCRδ ko. I risultati sono stati confermati anche in altri 2 topi, dimostrando un pattern di espressione simile dei marcatori memoria CD44, CD62L, CD122 nei linfociti T CD8 di midollo osseo dei topi wt e TCRδ ko.

Tali risultati indicano che il fenotipo memoria dei linfociti T CD8 di midollo osseo non è grossolanamente alterato in assenza di linfociti T γδ. Rimane da valutare se ci siano delle alterazioni fini della risposta antigene-specifica, quesito che va oltre lo scopo di questo progetto e potrà essere interessante tema di successive analisi.

La mia visita presso il laboratorio del prof. Hayday è stata proficua anche per progettare future collaborazioni sulla risposta al vaccino dell'influenza, e sulla risposta immunitaria anti-tumorale.

Roma, 14 marzo 2018

Francesca Di Rosa