

Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression

Deaglio, D.; Dwyer, K.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; Kuchroo, V.; Strom, T. e Robson, S. (2007)
The Journal of Experimental Medicine

Linfócitos T reguladores

Variedade fenotípica

Desafio: encontrar marcador específico para isolar e expandir população pretendida



IMUNOTERAPIA

Expresso em células CD4⁺ e CD8⁺ activadas

CD4⁺ / CD25⁺ / Foxp3⁺ → Localização intracelular

Ainda faltam marcadores extracelulares específicos para Treg

Linfócitos T reguladores

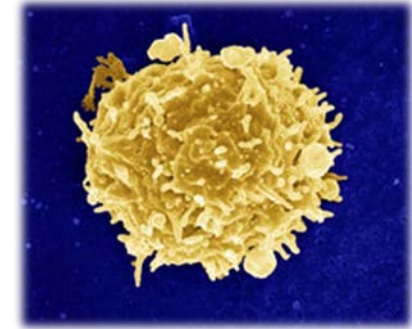
Perfil típico de Treg $CD4^+$ / $CD25^+$

Expressam TCR $\alpha\beta$

$CD62L^{high}$ e $CD5^{high}$

$CD45RB^{low}$ e $CD69^{low}$

$CD127^{low}$ – distingue Treg $CD4^+$ / $CD25^{high}$ / $Foxp3^+$ de outras células T activadas ($CD127^{high}$)



Imunoregulação por diferentes tipos de Tregs

$CD4^+$ / $CD25^{high}$ / $Foxp3^+$ Naturalmente comprimidas à imunoregulação (**nTreg**) –

Seleccionadas positivamente no timo

$CD4^+$ / $CD25^{high}$ / $Foxp3^+$ Indutíveis – Locus de $Foxp3$ metilado (**iTreg**)

Mecanismos de regulação por Treg CD4⁺/ CD25⁺

Mecanismos de supressão da resposta imune:

- Contacto directo (> *in vitro*);
- Mediadores solúveis (> *in vivo*)

Moléculas membranares:

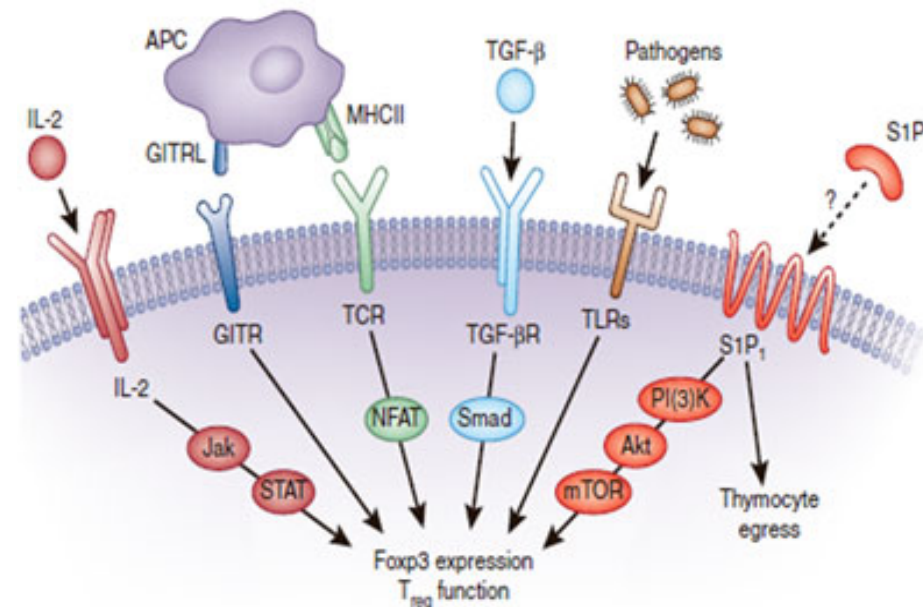
- Receptores de quimiocinas - (CCR4 ou **CD194** e CCR8 ou **CDw198**);
- Integrinas (**CD103**);
- **CD127** – receptor de IL-7;
- CTLA-4 (CD152).

Mediadores solúveis:

- IL-10
- TGF- β

Genes supressores

Menor expressão de Foxp3 resulta em menor expressão destes genes



Supressão da activação de células T por Treg

Linfócitos T Reguladores

CD4⁺ / CD25⁺ / Foxp3⁺

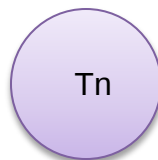


Contacto directo:

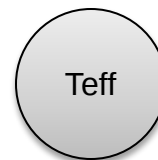
LAG-3 com outros sinalizadores
LFA-1 – agregação Treg a DC
LFA-1 e CTLA-4 (**CD152**) – sub-regulação de CD80/86

Factores solúveis:

IL-35 (Citocina)

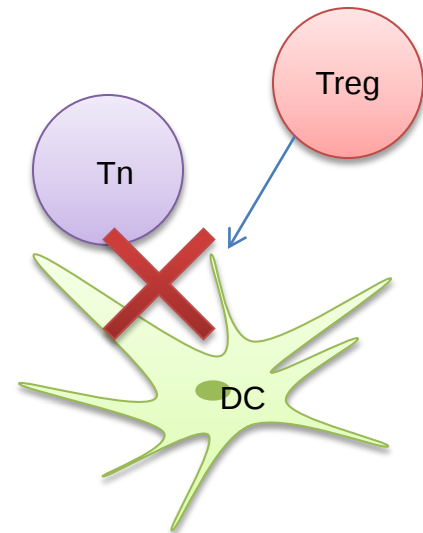


Activação



Linfócitos T virgens

CD4⁺ / CD25⁻ / Foxp3⁻

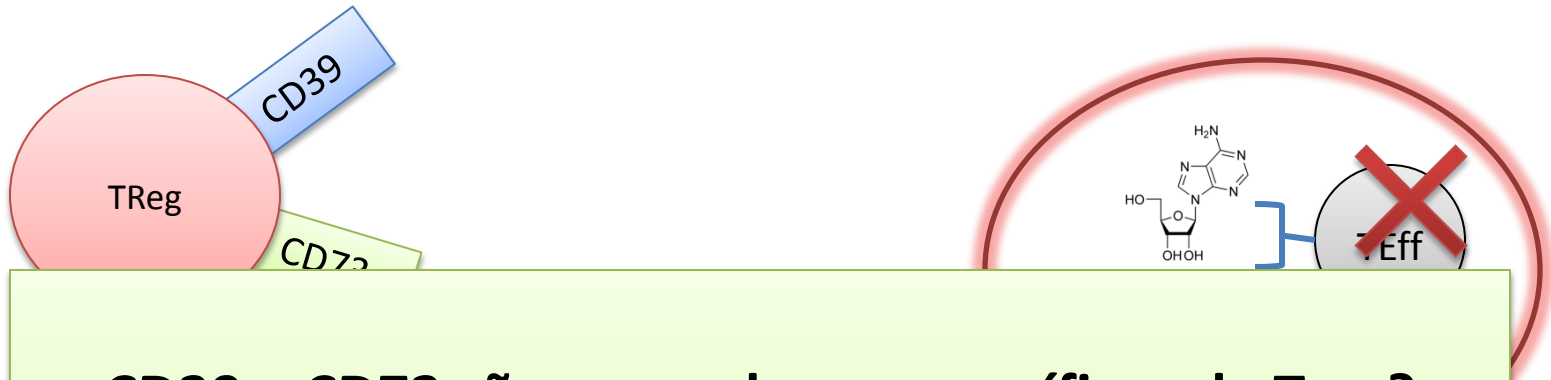


Linfócitos T efectores

CD4⁺ / CD25⁺ / Foxp3⁻

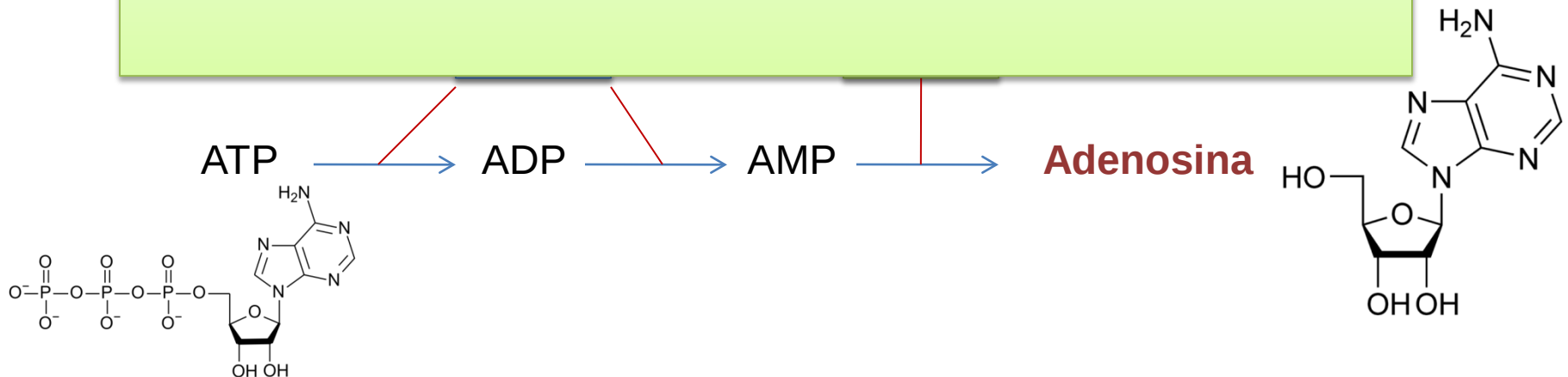
Geração de adenosina extracelular

Ectonucleotidase trifosfato difosfohidrolase



CD39 e CD73 são marcadores específicos de Treg?

Efeito adenosinérgico mediado por CD39 e CD73?

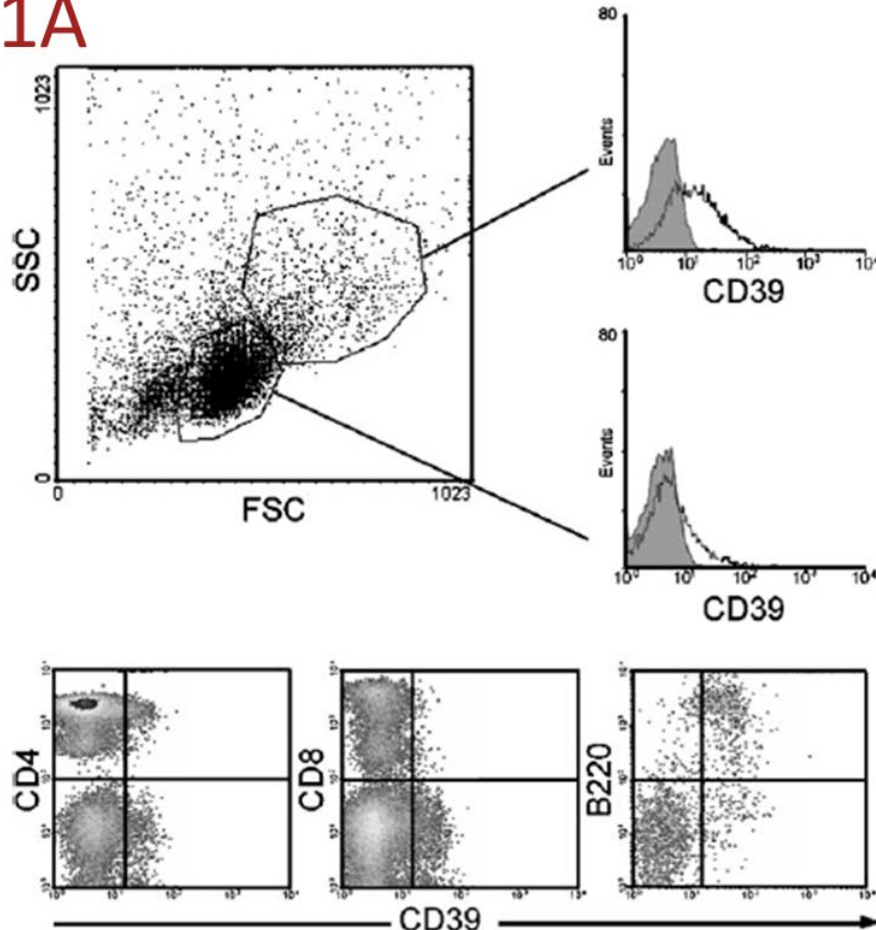


Expressão de CD39 em células Treg

In vitro

Verificar a expressão de CD39 em células Treg CD4⁺ / CD25⁺

1A



AbCD39 policlonal

Células de gânglios linfáticos

CD39

C57BL/6 (deficientes em Rag-1)

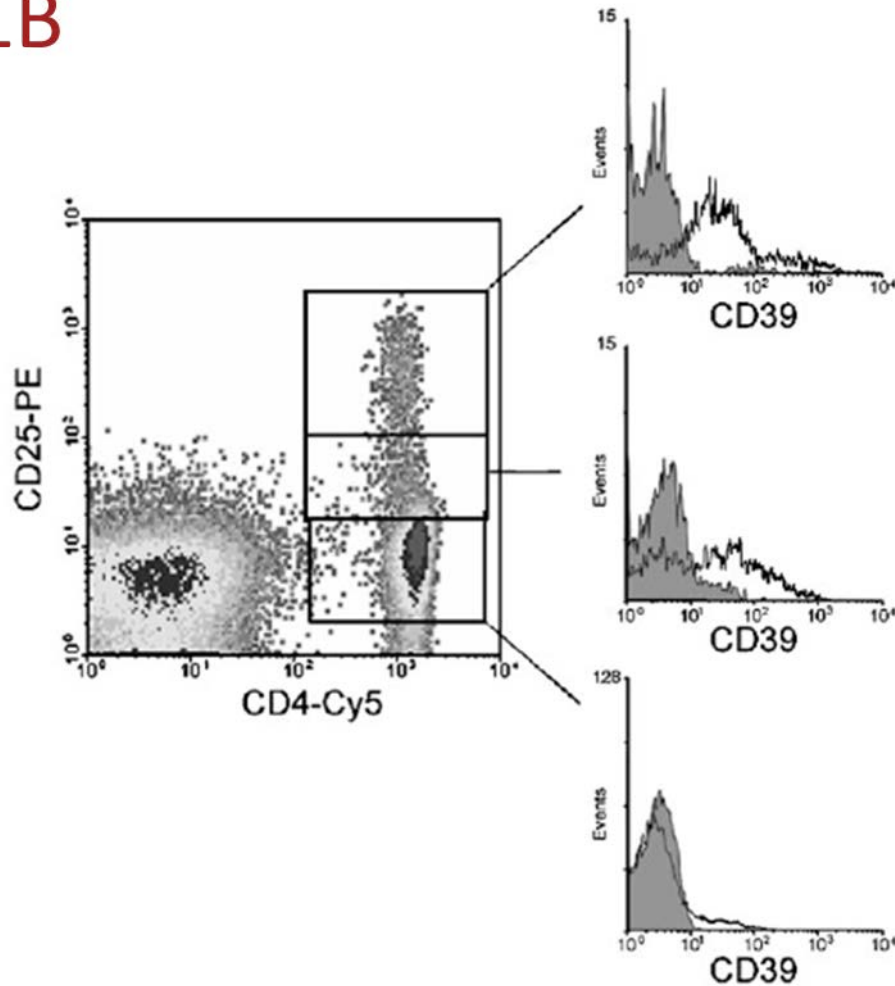
- maioria dos monócitos
- subpopulação de linfócitos

BB220⁺ (isoforma CD45RB)
CD4⁺
~~CD8⁺~~



Expressão de CD39 em células Treg

1B



In vitro

CD39

estirpe C57BL/6

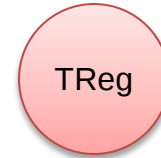
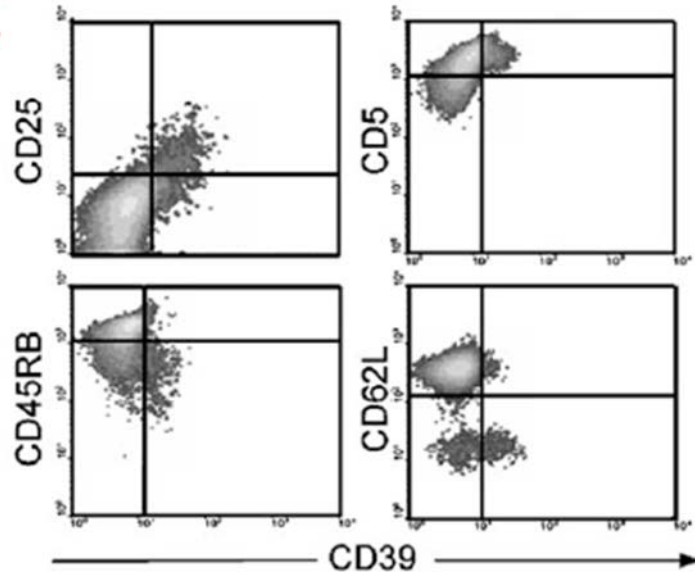
CD4⁺/CD25^{high}
CD4⁺/CD25^{dim}
CD4⁺/CD25⁻

estirpe BALB/c

CD4⁺/CD25^{high}

Expressão de CD39 em células Treg

1C



CD4⁺/CD39⁺

CD5^{high}
CD45RB^{high}
CD62L^{low}

CD39 expressão semelhante

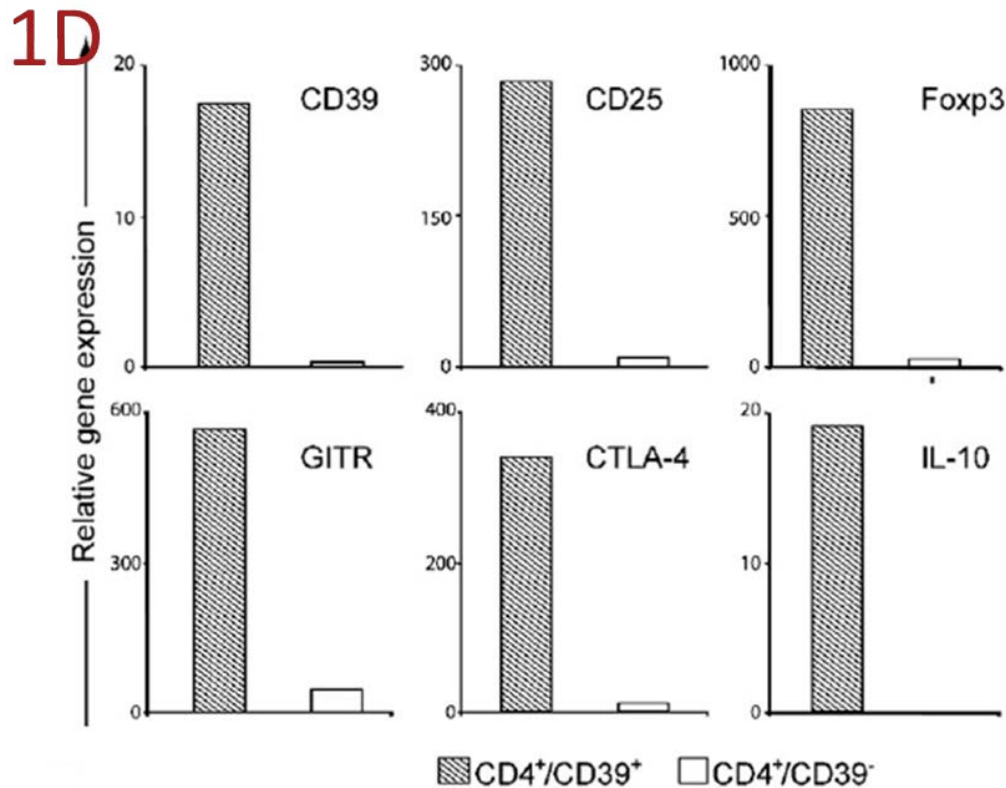
timócitos CD4⁺/CD8⁻/CD39⁺

células T periféricas CD4⁺/CD25⁺

Expressão de CD39 em células Treg

Em linfócitos

CD4⁺ $\xrightarrow{\text{expressão máxima}}$ mRNA CD39



Treg

Foxp3
CD25
GITR
CTLA-4
IL-10

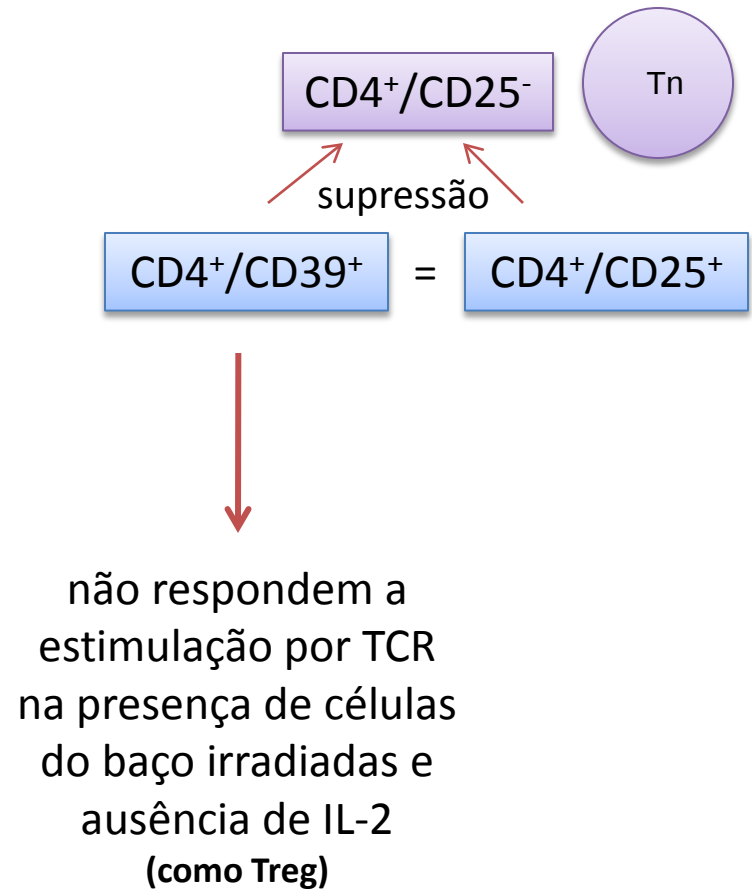
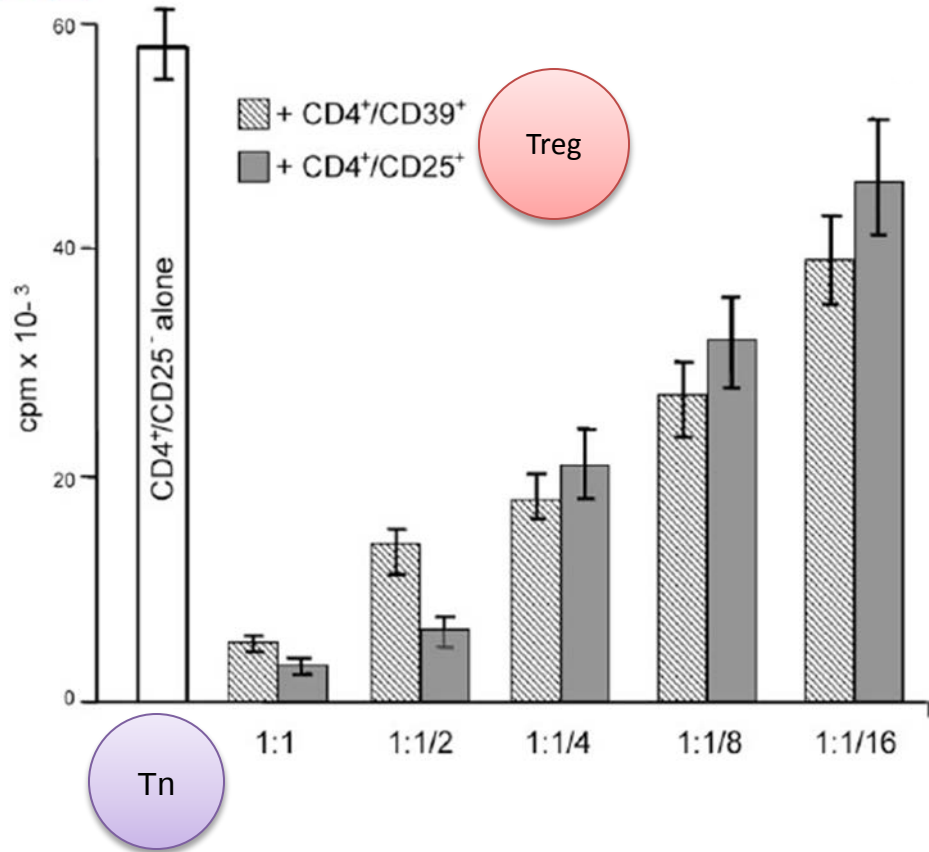


CD4⁺/CD39⁺
~~CD4⁺/CD39⁻~~

Perfil de expressão em concordância com o típico de Treg

Expressão de CD39 em células Treg

1E



Expressão de CD39 em células Treg

SOBREPOSIÇÃO
INCOMPLETA

CD4⁺/CD39⁺
CD4⁺/CD25⁺

Expressão Foxp3 em CD4⁺ é independente de CD25

CD25

não é suficiente para identificar Treg



mais marcadores de superfície

CD39

CD73



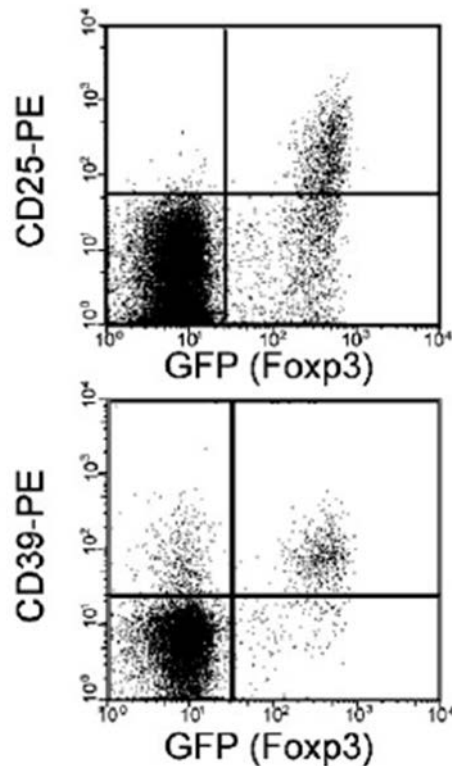
Fenótipo Treg/Foxp3

Expressão estabilizada por Foxp3

Expressão de CD39 em células Treg

Verificar a expressão de CD39 em células Treg Foxp3⁺

2A



Foxp3⁺ (GFP⁺)

gene reporter por *knock in*



80% expressam

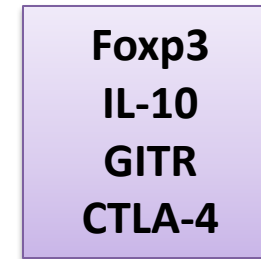
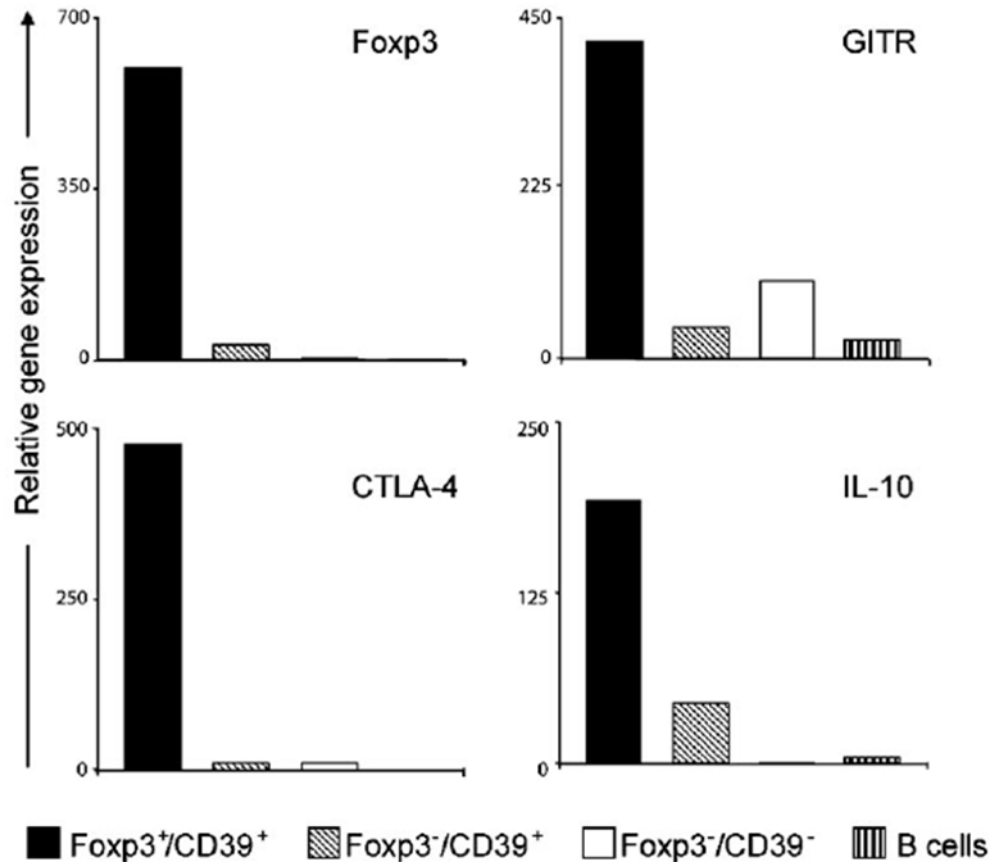
CD39

Marcador Treg mais consistente que CD25

- apenas 50% Foxp3⁺ (GFP⁺) expressam CD25
- fracção limitada Foxp3⁻ (GFP⁻) que expressam CD39

Expressão de CD39 em células Treg

2B



Expressão diferencial

Foxp3⁺/CD39⁻

Foxp3⁻/CD39⁺

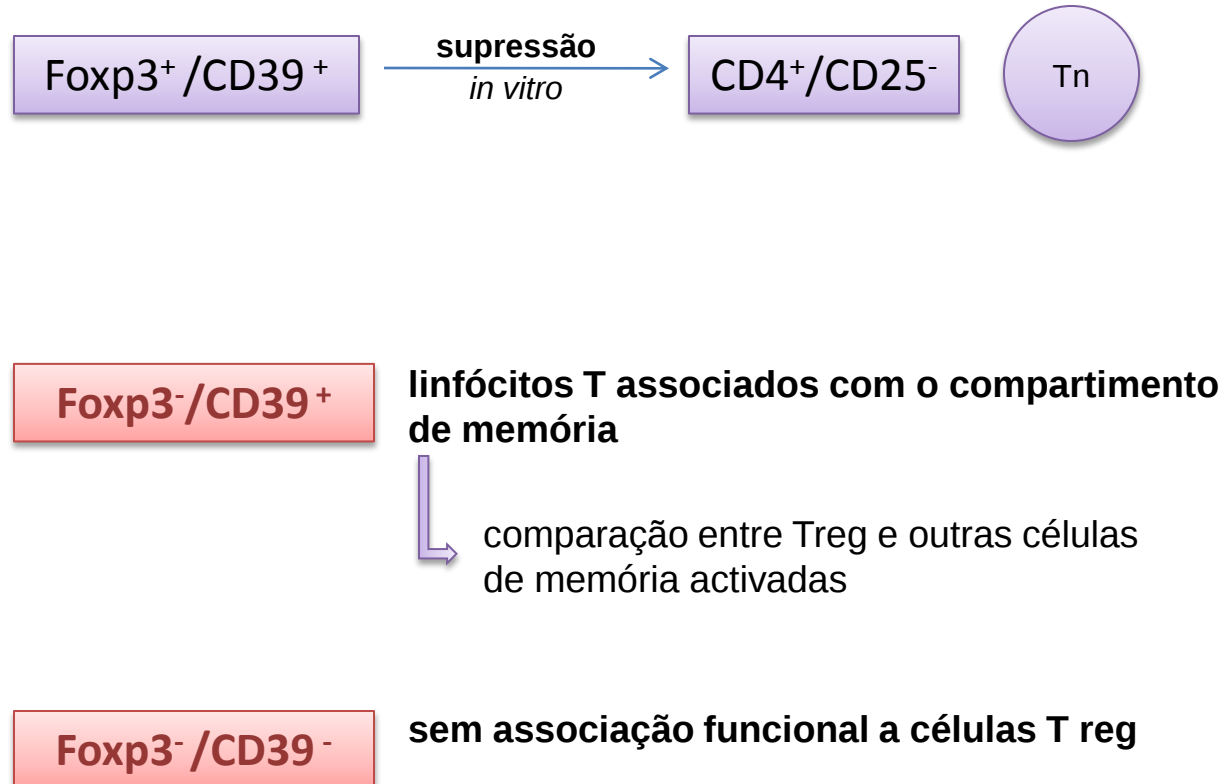
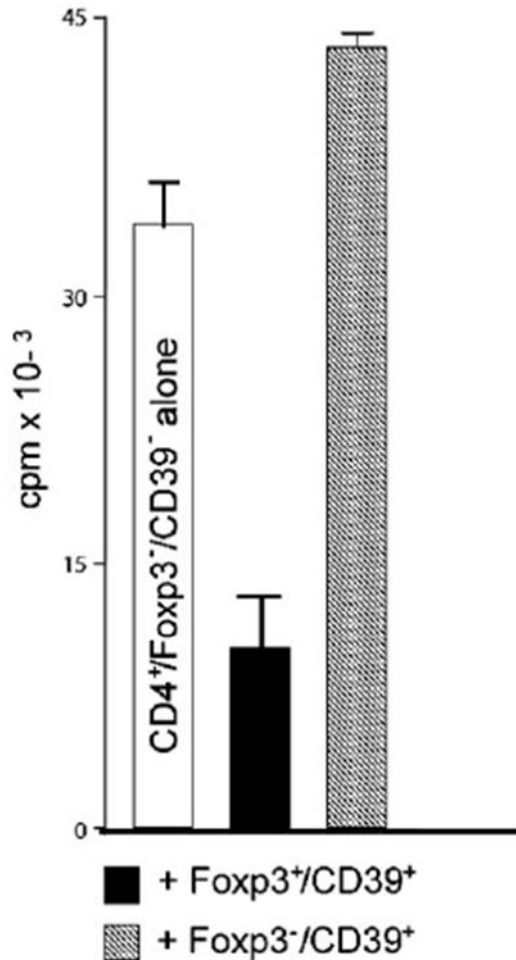
Foxp3⁺/CD39⁺



mimetiza perfil genético Treg

Expressão de CD39 em células Treg

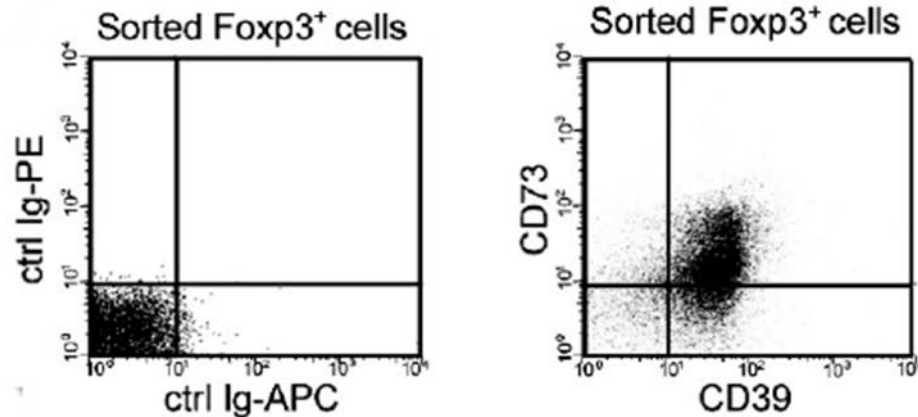
2C



Expressão de CD39 em células Treg

Verificar a expressão conjunta de CD73 e CD39 em células Treg Foxp3⁺

2D



Foxp3⁺ (GFP⁺)



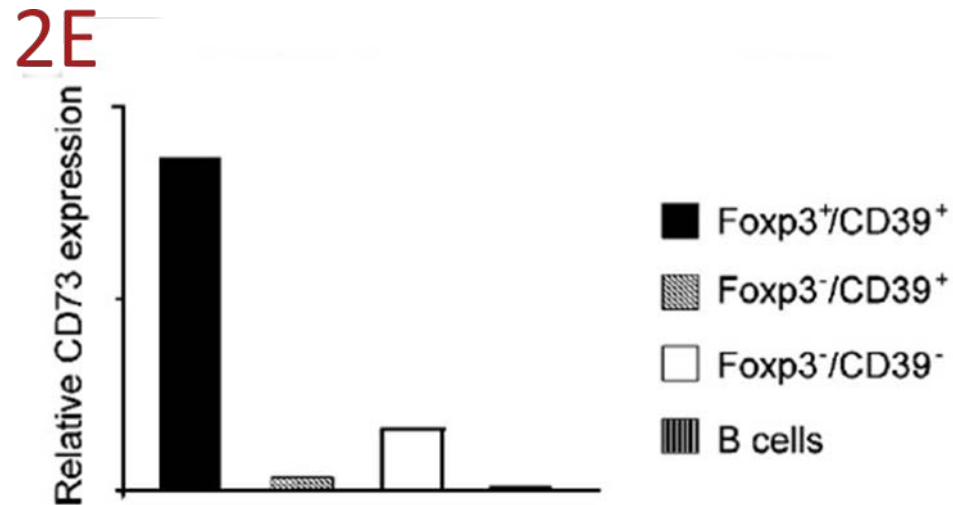
co-expressão ectonucleotidases

CD39

CD73

Marcadores
Treg

Expressão de CD39 em células Treg



CD4⁺/ CD39⁺/ CD73⁺

CD4⁺/ CD25⁺

Supressão semelhante

Expressão de CD39 e CD73

CD39



CD73

- Treg
- Monócitos
- Células endoteliais

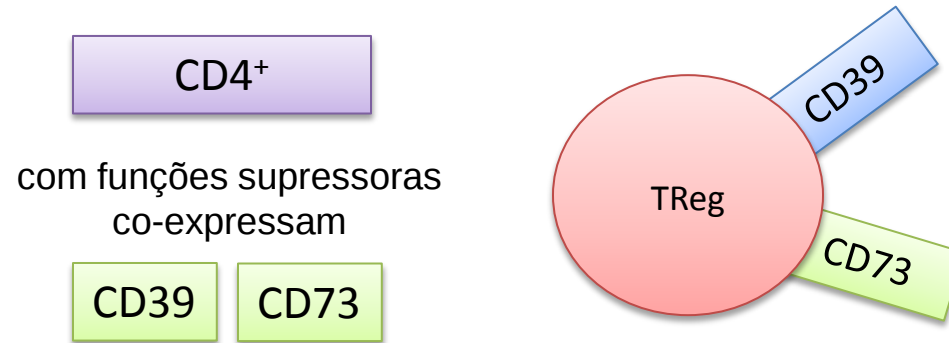
CD39

- Linfócitos B
- Células de Langerhans

CD73

- Subpopulações células T e B
- DC foliculares
- Fibroblastos medulares
- Células epiteliais

Função de CD39 e CD73?

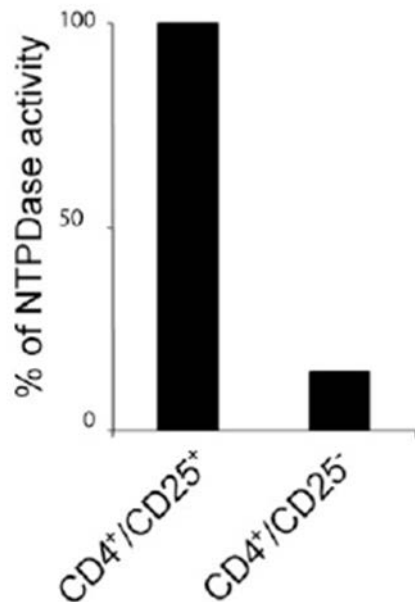


Papel das ectonucleotidases na regulação de células T?

Metabolismo de nucleótidos extracelulares por Treg

Testar a relação entre a expressão de adenosina e de Foxp3

3A



Actividade de NTPDase

enzima que desfosforila nucleótidos
(ATP → ADP → AMP)

CD4⁺/CD25⁺



atividade muito superior a

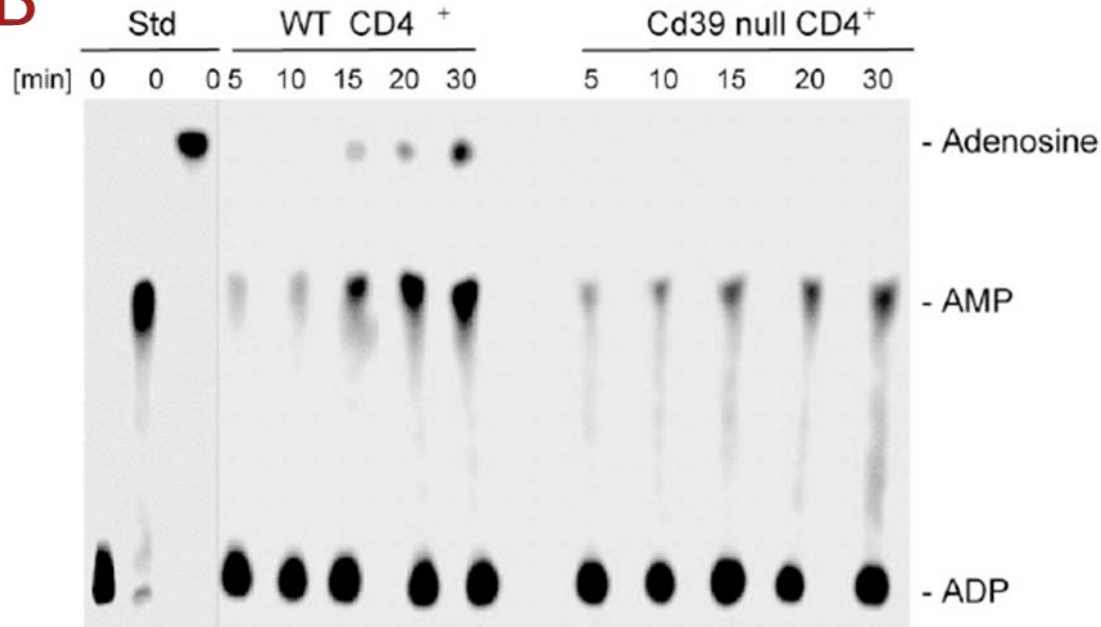


não exprimem CD39

CD4⁺/CD25⁻

Metabolismo de nucleótidos extracelulares por Treg

3B



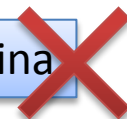
Nucleósidos marcados ^{14}C

WT CD4⁺

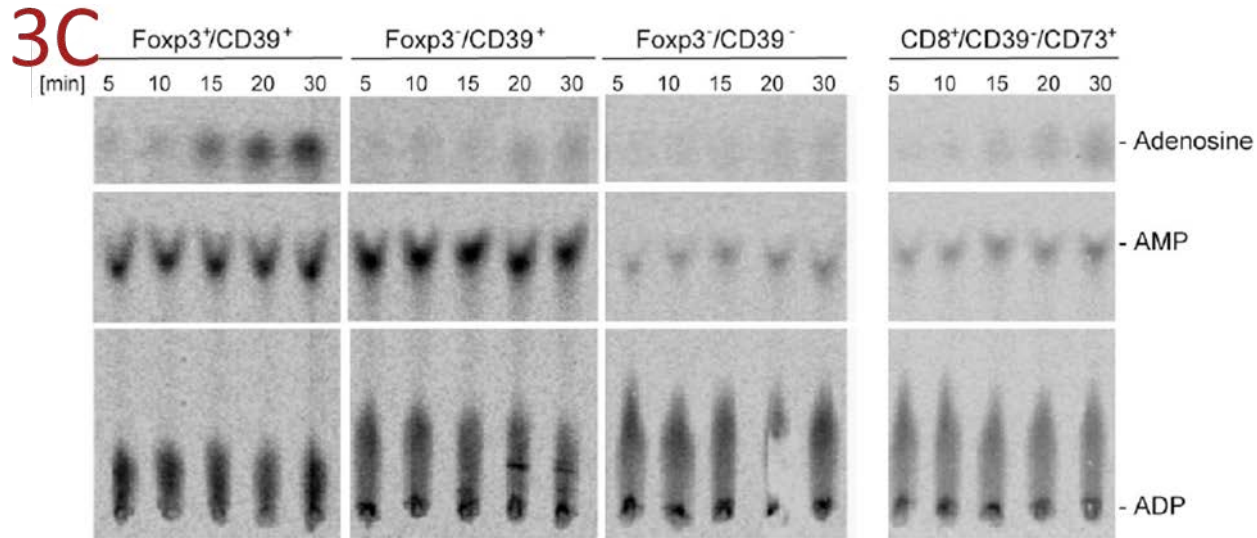
ADP $\longrightarrow$ AMP $\longrightarrow$ Adenosina

CD39-null CD4⁺

ADP $\longrightarrow$ AMP $\longrightarrow$ Adenosina



Metabolismo de nucleótidos extracelulares por Treg



Foxp3⁺ Treg

⇒ Expressam CD39

⇒ Síntese de Adenosina

Foxp3⁻/CD39⁺

Foxp3⁻/CD39⁻

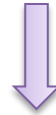
⇒ Não há síntese de Adenosina

Baixa expressão de CD73

Adenosina como supressora de células T

Adenosina

como supressor da proliferação



Ligação a GPCRs

Receptores de superfície celular associados a uma proteína G

A1

A2A

A2B

A3

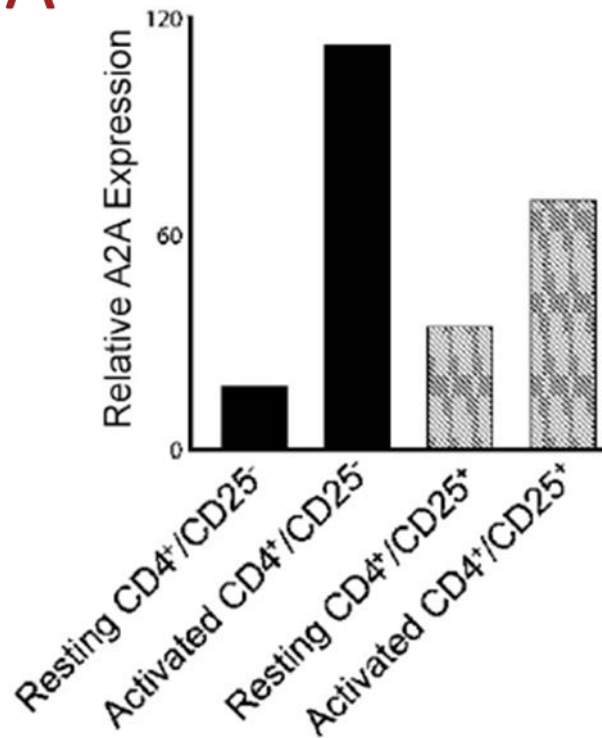


Receptor principal aquando de uma resposta anti-inflamatória em células T

Adenosina como supressora de células T

Verificar a expressão de A2A em T reg e CD4⁺/CD25⁻

4A



Quando *resting*

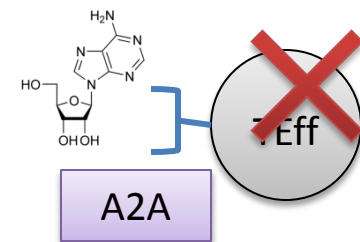
Treg

>

CD4⁺/CD25⁻

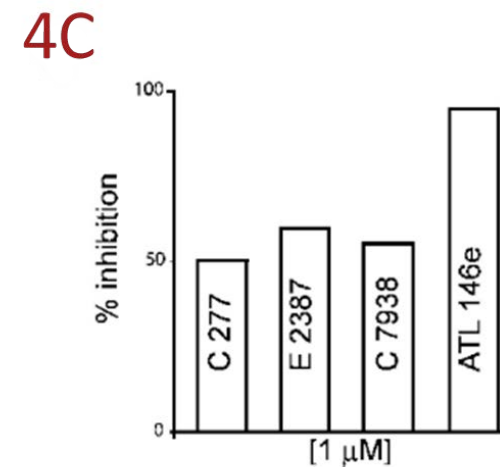
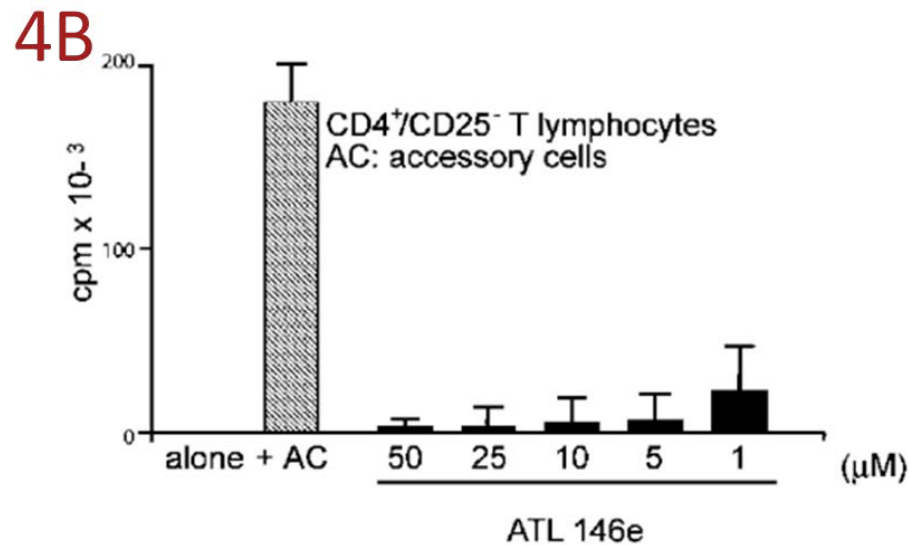
Na presença de CD39
justificam o estado
anérgico típico desta
população

Células T efectoras
adquirem receptores
A2A durante a
activação



Adenosina como supressora de células T

Influência da sinalização via A2A em CD4⁺/ CD25⁻



**Menor inibição
com agonistas
para A1 e A3**

ATL146e

inibição

CD4⁺/ CD25⁻

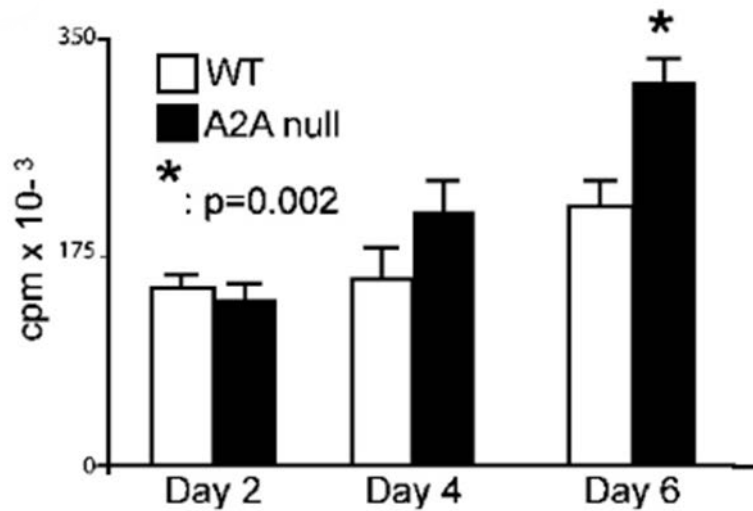
**Agonista
específico de
A2A**

dependente da dose de agonista

Adenosina como supressora de células T

Papel da expressão da adenosina na proliferação de $CD4^+/CD25^-$

4D



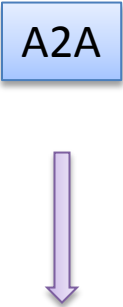
A2A-null - ratinhos mutantes nulos para receptor A2A

Aumento significativo da proliferação em resposta à estimulação com células acessórias que funcionam como APC

Adenosina como supressora de células T

Em concordância com regulação *upstream* do receptor

A2A



Funcional nas fases tardias de proliferação e activação das células T efectoras

Maior *leakage* de nucleótidos em células activadas e em hipóxia

Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

Testar se disrupção da cascata de CD39 afecta as funções de Treg

In vitro

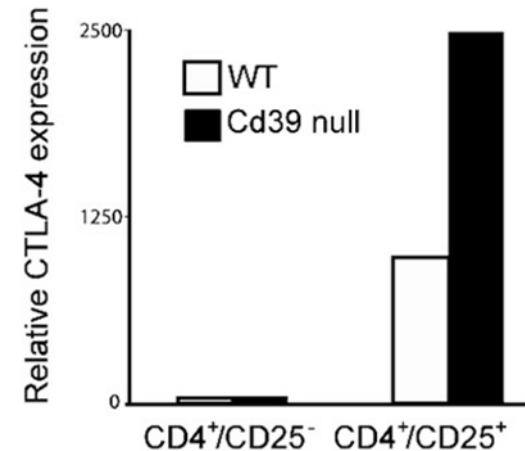
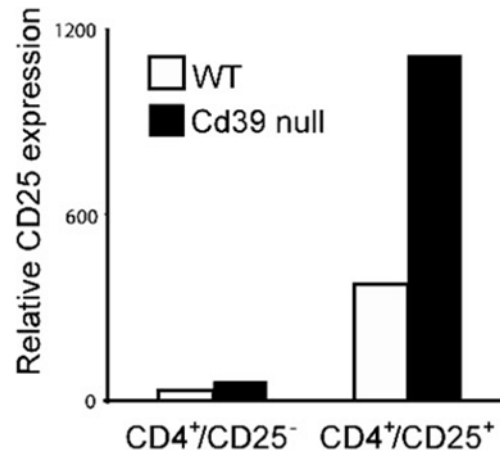
5A



Ratinho *Cd39*-null

CD4⁺ / CD25⁺

CD4⁺ / CD25⁻



Cd39-null T reg:

- Aumento da expressão de CD25 e CTLA-4 (sinalização aberrante)

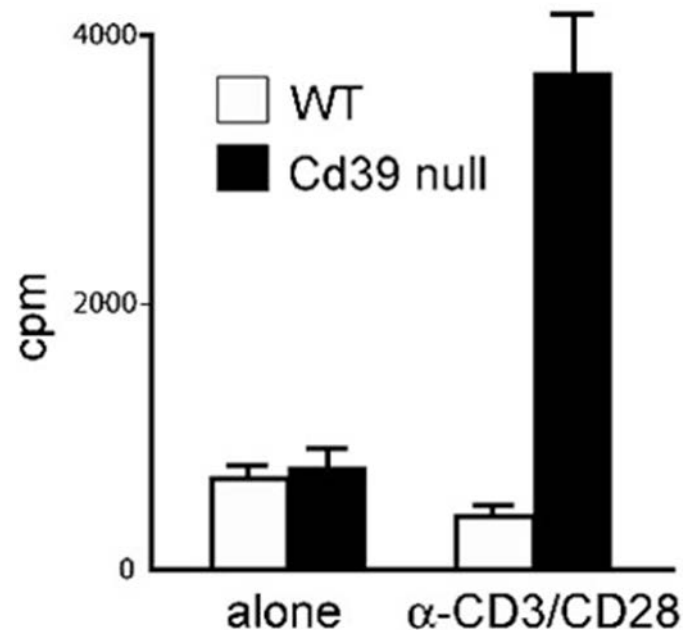
Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

In vitro



Ratinho *Cd39*-null
 $CD4^+$ / $CD25^+$

5B



Cd39-null T reg:

- Não são anérgicas
- Proliferam excessivamente em resposta a anti-CD3 e anti-CD28 e aloantígenos sem IL-2 exógeno

Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

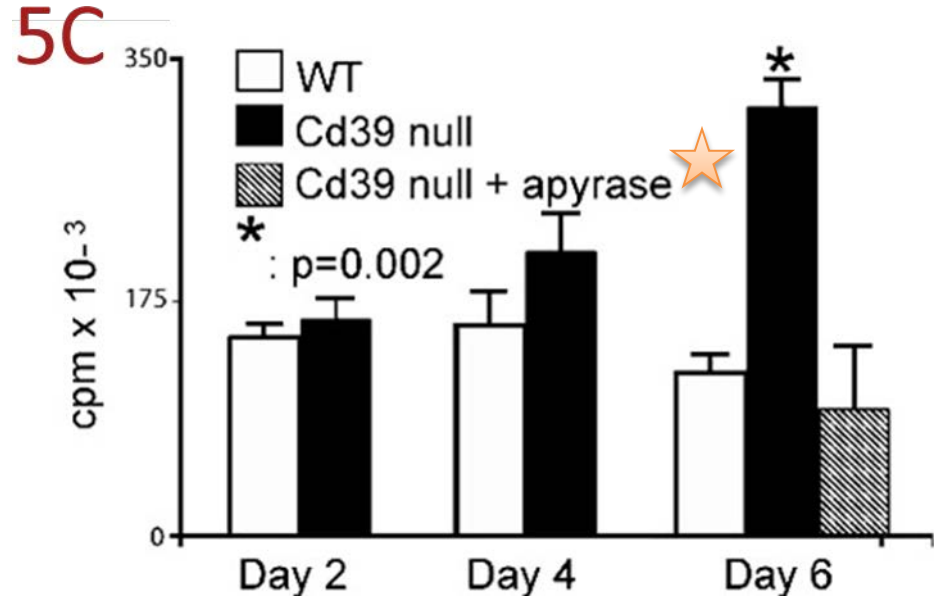
In vitro



Ratinho *Cd39*-null

CD4⁺ / CD25⁻

+
NTPDases



Cd39-null

Cd39-null + apyrase



CD4⁺ / CD25⁻

Proliferação anormal
a partir do 6º dia

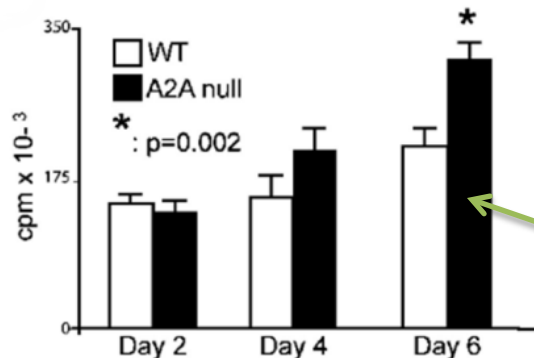
CD4⁺ / CD25⁻

Supressão da proliferação
anormal

Momento coincidente com o
aumento de expressão de A2A

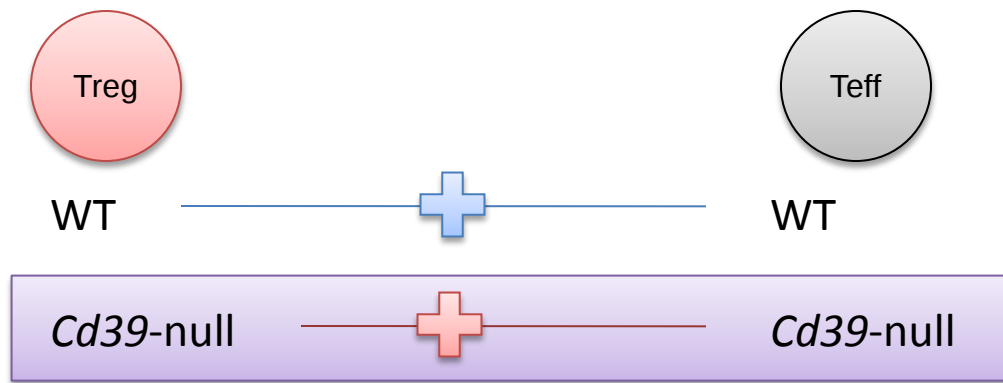
Treg
Recuperação da anergia

4D



Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

Testar se Treg de murganhos WT e *Cd39*-null inibem proliferação de Teff

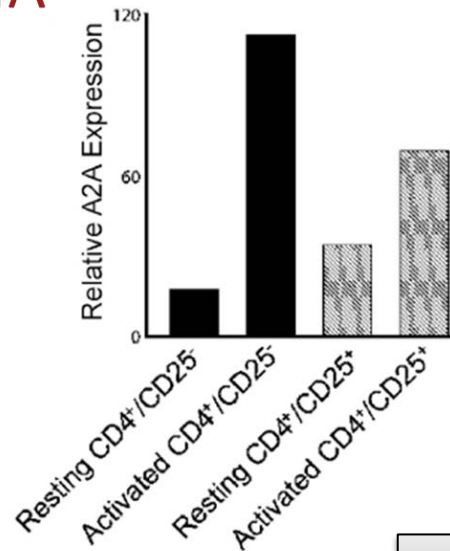


50-60% menos eficientes na supressão da proliferação de Teff

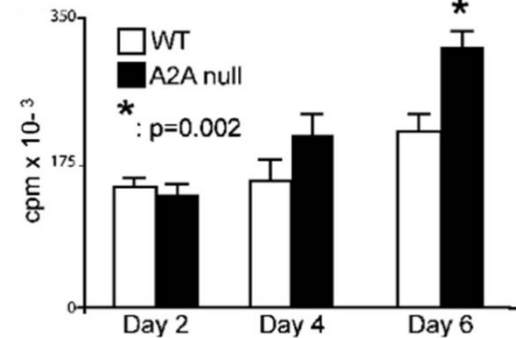
Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

Testar se Treg de murganhos WT e *Cd39*-null inibem proliferação de Teff de murganhos A2A-null

4A



4D

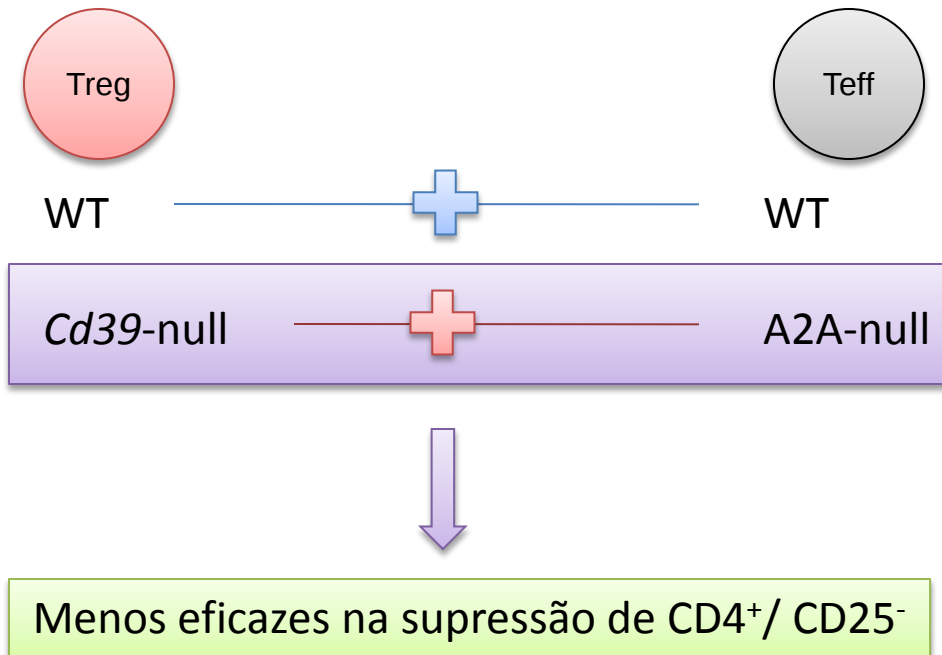


Cinética A2A

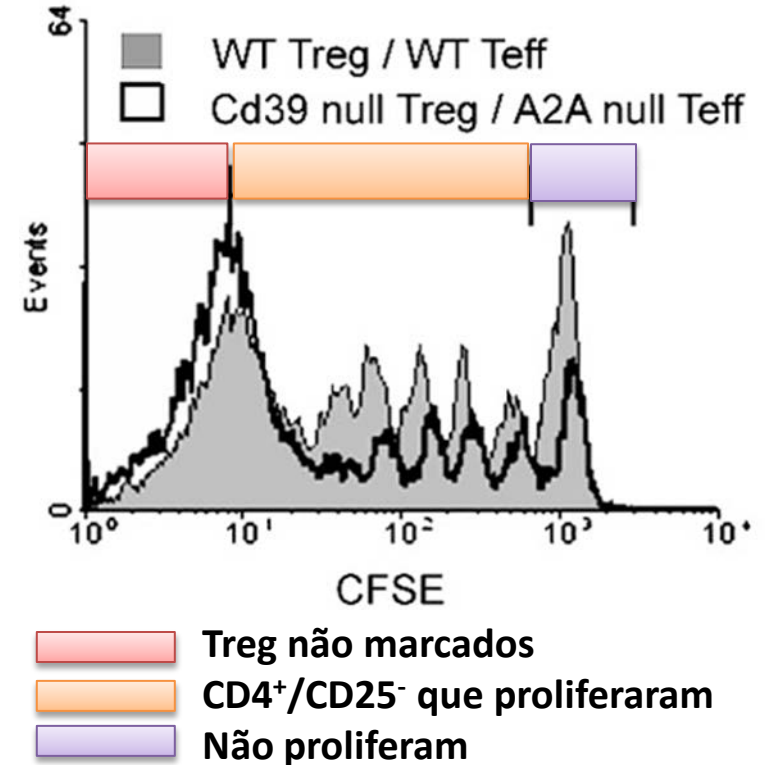
Teste feito ao 5º dia após activação

Sem Treg, Teff proliferam

Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina



5D

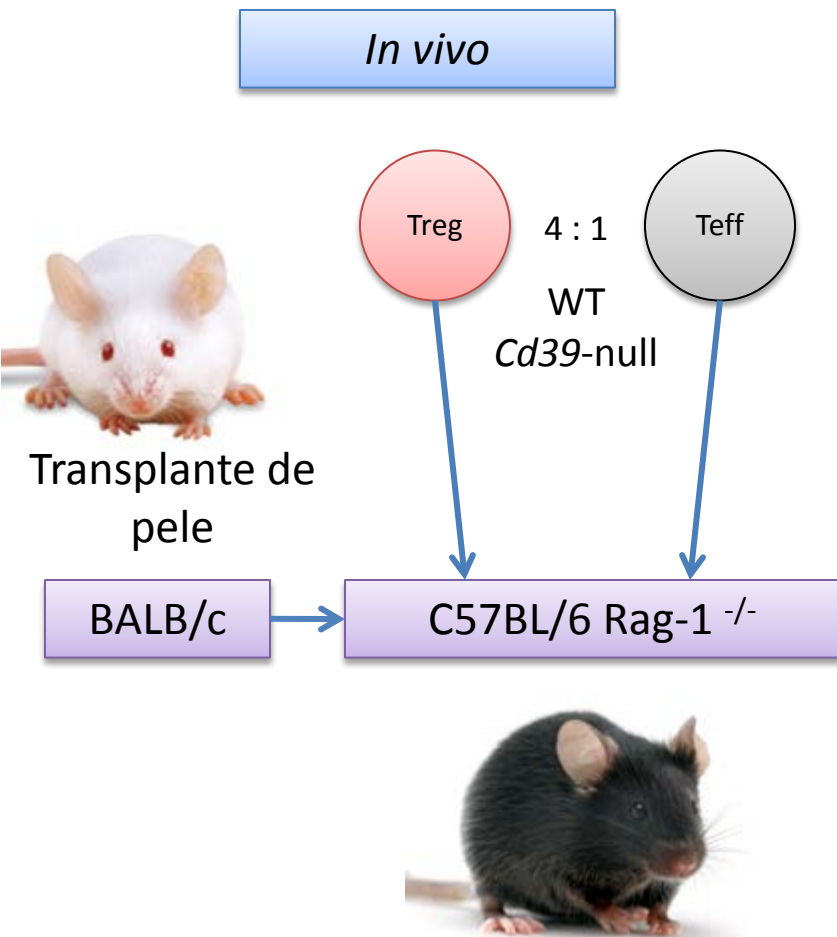


Análises precoces não demonstravam diferença entre WT e *Cd39*-null

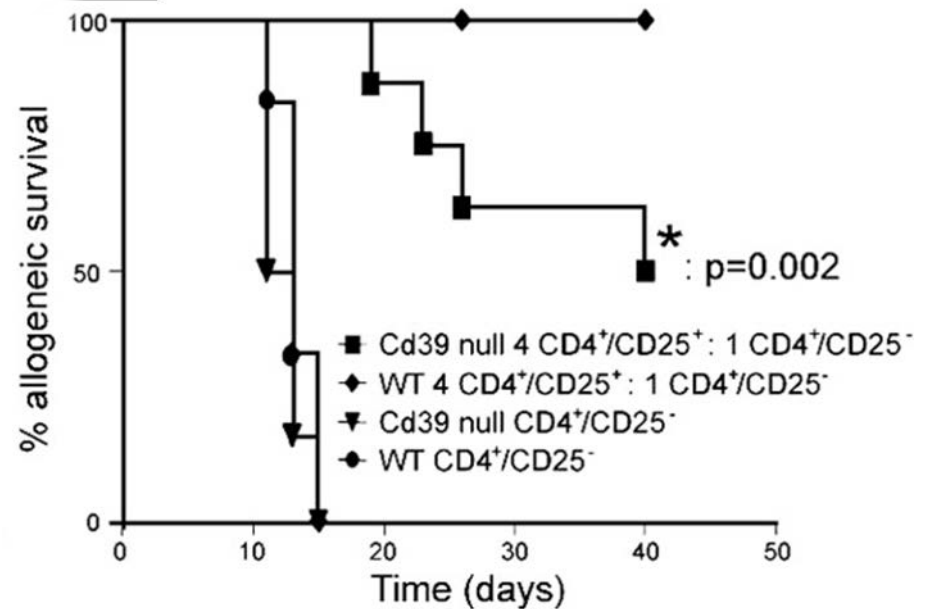
EFEITO REGULATÓRIO TARDIO

Efeito de CD39 nas oscilações de adenosina

Efeito de Treg de murganhos WT e Cd39-null em transplantes alográficos

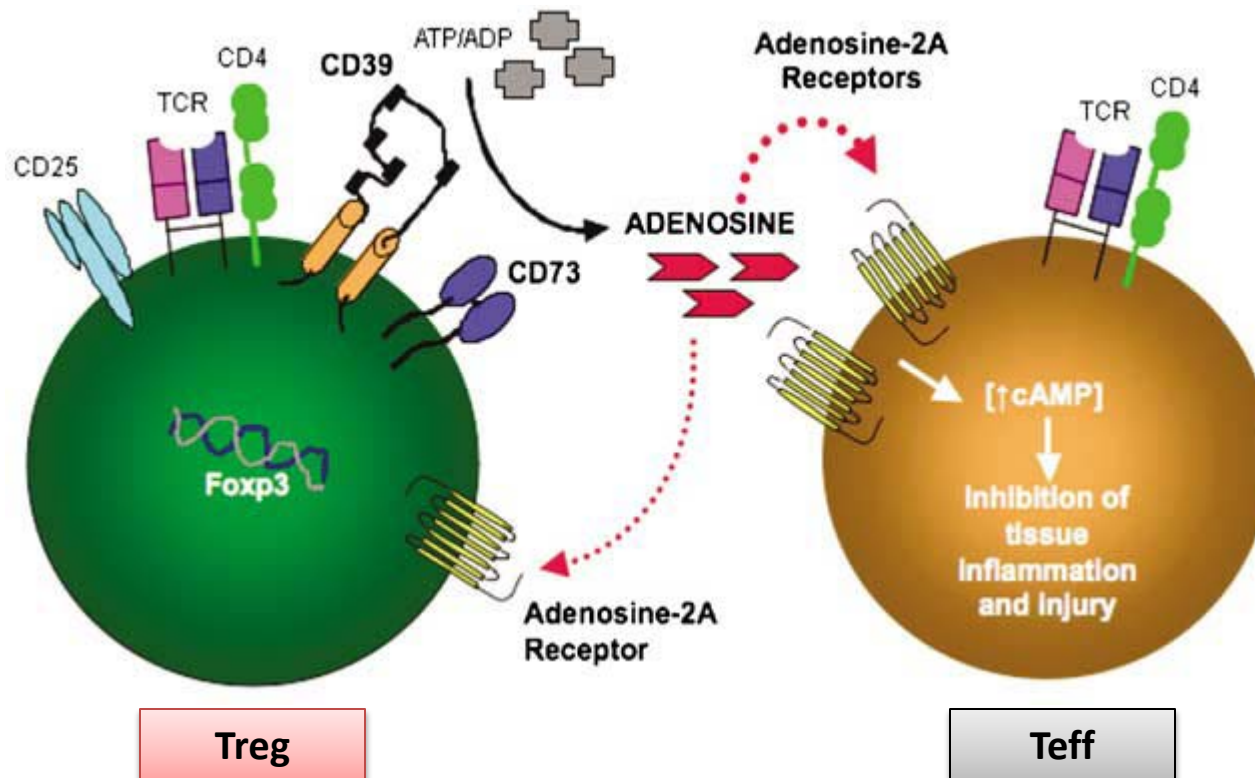


5E



CD39 suprime CD4⁺ / CD25⁻ *in vivo*

CD39 um melhor marcador específico para Treg do que **CD25**



CD39 com **CD73** formam adenosina pericelular que parece ter um papel importante na supressão das células T efectoras

Desenvolvimentos e perspectivas

Treg CD39⁺/CD73⁺ → Tregs efectores/de memória (T_{REM})

Murganhos: CD39 em todas as Foxp3⁺

Humanos: CD39 só em subpopulação de T_{REM}

ATP proveniente de células
apoptóticas e de *leakage*

Treg CD39⁺CD73⁺

Imunoregulação - homeostasia



Referências bibliográficas

- Abbas K, Lichtman AH, Pillai S (2007) **Cellular and Molecular Immunology** (6th ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Abbas, K, Lichtman, AH (2006) **Basic Immunology: with student consult access** (2th ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby,J (2006) **Immunology** (6th ed.) W. H. Freeman and Co., New York
- Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson SC, Ohta A (2008) **Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells** British Journal of Pharmacology 153, S457–S464
- Salcido-Ochoaa F, Tsangb J, Tamb P, Falkc K, Rotzschked O (2010) **Regulatory T cells in transplantation: does extracellular adenosine triphosphate metabolism through CD39 play a crucial role?** Transplantation Reviews 24: 52–66

Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression

Deaglio, D.; Dwyer, K.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; Kuchroo, V.; Strom, T. e Robson, S. (2007)
The Journal of Experimental Medicine

Supressão após activação de células T

