

Relazione Annuale Assegno di Ricerca A.A. 2015-2016

Meccanismi di regolazione dell'espressione di fattori di stimolo dei B linfociti sulla membrana dei basofili

Introduzione.

I basofili giocano un ruolo importante nella patogenesi delle malattie allergiche, sia come cellule effettrici, che come cellule dell'immunità innata, capaci di condizionare la risposta linfocitaria in senso Th2. I meccanismi di regolazione dell'attivazione e della degranulazione dei basofili sono solo parzialmente conosciuti. Il test di attivazione dei basofili (BAT) è diventato un importante test in vitro basato sulla citofluorimetria a flusso che permette di quantificare i basofili e la loro attivazione superando come efficacia e velocità i vecchi saggi di quantificazione di rilascio dei mediatori.

I marker di attivazione dei basofili usati per il BAT test son il CD63 e il CD203c, e l'analisi combinata di questi due marcatori con il contenuto e il successivo rilascio di istamina, possono essere studiati in citofluorimetria per valutare funzionalmente la risposta in vitro dei basofili dopo stimolazione.

Durante questo anno di assegno di ricerca i filoni seguiti per studiare il ruolo dei basofili nell'orchestrare le risposte immunitarie allergiche, non solo come cellule effettrici, ma anche come cellule in grado di creare un ponte tra immunità innata e adattativa sono stati due: uno focalizzato sul dialogo tra basofili e B linfociti, analizzando l'espressione di BAFF (Fattore di Attivazione dei B linfociti) in pazienti asmatici, e uno focalizzato sul dialogo tra basofili e T linfociti, analizzando l'espressione di ICOS e del suo ligando sui basofili di soggetti con rinite allergica.

Filone di ricerca sul BAFF. Il BAFF (Fattore di Attivazione dei B linfociti) è un importante regolatore dell'attivazione, proliferazione e produzione di IgE da parte dei linfociti B. Riniti allergiche e asma allergici sono caratterizzati da un'alta produzione di IgE allergene specifiche alle proteine allergeniche alle quali il soggetto è sensibilizzato (pollini, acari della polvere, muffe..). In



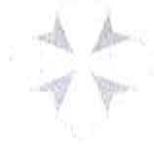
alcuni pazienti si può osservare uno spiccato aumento delle IgE totali, in particolare nei pazienti con asma severo e sensibilizzazione a funghi o nei pazienti con Aspergillosi Bronco Polmonare Allergica (ABPA).

Molte osservazioni recenti hanno riportato un ruolo centrale del BAFF nelle malattie respiratorie allergiche. Il BAFF è risultato essere aumentato nel lavaggio broncoalveolare di pazienti allergici dopo challenge bronchiale con allergene, aumentato nello sputo indotto di soggetti asmatici, e aumentato nello strato epiteliale nasale di soggetti affetti da rinosinusite cronica con polipi (caratterizzata da elevati livelli di IgE). E' inoltre noto che i granulociti neutrofili, che condividono con i basofili l'origine mielopoietica, sono in grado di rilasciare il BAFF in seguito a esposizione a stimoli pro-infiammatori.

Visto il ruolo centrale dei basofili nei processi allergici, e vista la comune origine ematopoietica dei basofili e dei neutrofili, ci siamo chiesti se anche i basofili di soggetti allergici e non allergici esprimessero il BAFF sulla loro membrana, e se questa espressione fosse aumentata da stimoli IgE-dipendenti o IgE-indipendenti (ligandi dei Toll Like Receptors 2 e 4).

Filone di ricerca focalizzata su ICOS e ICOS-L. ICOS è un membro della superfamiglia CD28 ed è un recettore cruciale per la sopravvivenza e la funzione delle cellule T, della differenziazione cellulare T-helper e dell'induzione delle risposte infiammatorie polmonari. ICOS ligando (ICOS-L), uno dei cinque componenti della famiglia B7, è espresso sulle cellule presentanti l'antigene nonché su diversi tipi di cellule non immuni. Il legame di ICOS al suo ligando attiva una cascata di molecole di segnalazione intracellulare che impedisce l'apoptosi delle cellule T e induce la produzione di diversi tipi di citochine a seconda del microambiente citochinico nel quale esse si trovano. Molto recentemente è stato dimostrato che i linfociti innati di tipo 2 (ILC2) esprimono ICOS e ICOS-L sulla loro membrana, e che l'interazione ICOS:ICOS-L è necessaria per la funzione delle ILC2 e fornisce un segnale di sopravvivenza per le stesse cellule. Se basofili, cellule dell'immunità innata come le ILC2, esprimano ICOS o ICOS-L sulla loro membrana non è noto.

Visto il ruolo centrale dei basofili nei processi infiammatori polmonari e nell'asma (evidenziato nelle nostre ricerche dello scorso anno durante il precedente contratto di assegno di ricerca), e vista la comune appartenenza all'immunità innata dei basofili e delle ILC2, ci siamo chiesti se anche i basofili di soggetti allergici e non allergici esprimessero ICOS e ICOS-L sulla loro membrana, e se questa espressione fosse aumentata da stimoli IgE-dipendenti o IgE-indipendenti.



Metodi.

Filone di ricerca sul BAFF. Selezione di pazienti allergici ad ambrosia (n = 5), graminacee (n = 5), *Aspergillus Fumigatus* (n = 6) più 11 controlli sani. I basofili del sangue periferico sono stati stimolati con stimoli IgE dipendenti (IgE e allergeni specifici) e IgE indipendenti (fMLP, LPS, 1,3 beta glucano, acido lipoteicoico), per valutare l'espressione dei marcatori di membrana di attivazione (CD63 e CD203c) e del BAFF.

Filone di ricerca su ICOS e ICOS-L. Selezione di pazienti con rinite allergica (n = 5) più 6 controlli sani. Dopo la valutazione dell'espressione basale di ICOS e di ICOS-L, i basofili del sangue periferico sono stati stimolati con IgE, fMLP per valutare variazioni di espressione in membrana dei suddetti marcatori. Inoltre, per valutare la funzione di ICOS-L sulla membrana dei basofili, abbiamo valutato l'attivazione dei basofli (upregolazione di CD63 e produzione di IL-4) in tre pazienti allergici e tre soggetti sani, in seguito a stimolazione con ICOS solubile, da solo e in associazione a stimolazione con IgE o in associazione a stimolazione con allergene specifico.

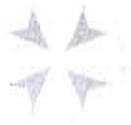
Risultati.

Filone di ricerca sul BAFF. I basofili di soggetti allergici e non allergici esprimono costitutivamente il BAFF sulla loro membrana, senza differenze tra i due gruppi.

Nei pazienti allergici ad ambrosia e graminacee, stimolazioni con IgE e allergeni specifici non apportano aumento nell'espressione del BAFF sulla membrana dei basofili. La stimolazione con *Aspergillus Fumigatus* è in grado di aumentare in maniera statisticamente significativa l'espressione del BAFF su pazienti sensibilizzati e controlli, probabilmente attraverso un meccanismo non IgE mediato, visto che l'aumento avviene anche sui basofili di soggetti non allergici.

Stimoli IgE-indipendenti come fMLP e ligandi del TLR-2 (1,3 beta glucano, LTA_SA) ma non del TLR-4 (LPS) sono in grado di aumentare, come l'*Aspergillus Fumigatus*, in maniera statisticamente significativa l'espressione di BAFF sulla membrana dei basofili dei soggetti sani e dei soggetti allergici.

Filone di ricerca su ICOS e ICOS-L. ICOS-L, ma non ICOS, è basalmente espresso sulla membrana dei basofili di soggetti allergici e di soggetti sani senza differenze tra i due gruppi (cellule esprimenti ICOS-L: $4,75 \pm 6,21$ vs $6,74 \pm 5,9$ %, rispettivamente nei soggetti allergici e



soggetti sani). Stimolazione con IgE e fMLP sono in grado di aumentare l'espressione di ICOS-L, sui basofili di soggetti allergici e sani: nei primi da $4,75 \pm 6,21$ a $17,92 \pm 12,7$ % ($p = 0.05$) e a $8,92 \pm 7,27$ ($p=0.04$) in seguito rispettivamente a stimolazione con IgE e fMLP e nei controlli sani da $6,74 \pm 5,9$ a $48,76 \pm 44,16$ % ($p=0,03$) e a $17,2 \pm 17$ ($p=0.05$) dopo stimolazione rispettivamente con IgE e fMLP, senza differenze significative tra i due gruppi.

La stimolazione di ICOS-L con un costrutto solubile FAB2-like di ICOS, ottenuto fondendo la porzione extracellulare di ICOS con il dominio CH3 delle IgG1, a differenti tempi di incubazione (20,40 e 60 minuti) non ha influenzato l'espressione di ICOS-L sulla membrana dei basofili e non ha indotto l'upregolazione del CD63.

Per quanto riguarda la produzione di IL-4, la stimolazione di ICOS-L con ICOS solubile da solo era in grado di aumentare i livelli di IL-4 intracitoplasmatici, in paragone ai livelli basali, sia in soggetti allergici che in soggetti sani, senza differenze significative tra i due gruppi.

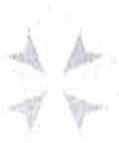
La stimolazione con ICOS solubile insieme alle IgE ha indotto un incremento maggiore dei livelli di IL-4 intracitoplasmatici in paragone ai livelli basali e ai livelli ottenuti con stimolazione con ICOS solubile da solo, senza differenze significative tra soggetti allergici e soggetti sani.

La stimolazione con ICOS solubile insieme a stimolazione con allergene specifico nei pazienti sensibilizzati ha indotto un incremento maggiore dei livelli di IL-4 intracitoplasmatici in paragone ai livelli basali e ai livelli ottenuti con stimolazione con ICOS solubile da solo e insieme alle IgE.

Conclusioni e Prospettive.

Filone di ricerca sul BAFF. Il BAFF è costitutivamente espresso sulla membrana dei basofili e tale espressione non è aumentata da stimolazione con IgE o allergeni, ma è aumentata dall'*Aspergillus Fumigatus* e dai ligandi dei TLR-2, sia in soggetti allergici che nei soggetti sani.

L'aumento di BAFF in seguito a stimolazione con *Aspergillus Fumigatus* potrebbe essere correlata all'engagement del TLR-2 e quindi contribuire alla produzione e incremento delle IgE policlonali comunemente riscontrate nei pazienti con asma severo e sensibilizzazione fungina o nei pazienti con Aspergilloso Bronco Polmonare Allergica (ABPA). I basofili potrebbero quindi contribuire a creare un link tra immunità innata e adattativa, dialogando direttamente con i B linfociti e inducendone la produzione di IgE.



Ulteriori studi sono necessari per capire esattamente questa nuova funzione biologica dei basofili, ponendo il BAFF come candidato ad essere un eventuale target terapeutico nelle malattie allergiche caratterizzate da elevati livelli di IgE.

Filone di ricerca su ICOS e ICOS-L. I basofili di controlli sani e di pazienti allergici esprimono ICOS-L (ma non ICOS) sulla loro membrana e l'espressione è upregolata dalla stimolazione con IgE e fMLP. Il legame di ICOS solubile a ICOS-L sulla membrana dei basofili non induce attivazione dei basofili (nessuna upregolazione di CD63).

Il legame di ICOS solubile con ICOS-L sembra invece in grado di attivare i basofili in maniera diversa, inducendo la produzione e il rilascio di mediatori citochinici, nel caso dei basofili di IL-4.

La stimolazione più efficace nell'indurre un aumento dei livelli di IL-4 intracitoplasmatici sembrerebbe essere l'unione di ICOS solubile alla stimolazione con allergene specifico, che potrebbe quindi spiegare e suggerire un'interazione funzionale tra basofili, che portano ICOS-L sulla loro membrana e sono in grado di secernere grandi quantità di IL-4, e cellule dell'immunità adattativa, in questo caso i linfociti Th2 che portano ICOS sulla loro membrana, permettendo una interazione tra immunità innata e adattiva nell'iniziare e mantenere la risposta Th2 allergica.

Ulteriori studi sono necessari per capire esattamente questa nuova funzione biologica dei basofili, prospettando la possibilità che la modulazione dell'espressione di ICOS-L possa rappresentare una strategia terapeutica delle patologie allergiche più gravi.



I dati della presente ricerca sono stati presentati nei seguenti congressi e pubblicati sulle seguenti riviste:

- **Boita M.**, Heffler E, Pizzimenti S, Raie A, Saraci E, Omedè P, Bussolino C, Bucca C, Rolla G. **Regulation of B-cell-activating factor expression on the basophil membrane of allergic patients.** Int Arch Allergy Immunol. 2015;166(3):208-12
- **Boita M.**, Dianzani U, Bucca C, Rolla G. **ICOS ligand expression on basophils membrane.** Accepted for presentation in a Poster Discussion Session (PDS) at the EAACI Congress 2016, held in Vienna, Austria, 11-15 June 2016.

Torino, 15 settembre 2016

Dott. Boita Monica

Prof. Giovanni Rolla



Articolo su rivista

Boita M, Heffler E, Pizzimenti S, Raie A, Saraci E, Omedè P, Bussolino C, Bucca C, Rolla G.
Regulation of B-Cell-Activating Factor Expression on the Basophil Membrane of Allergic Patients. Int Arch Allergy Immunol. 2015 Apr 22;166(3):208-212.

Original Paper

International Archives of
Allergy
Immunology

Int Arch Allergy Immunol 2015;166:208–212
DOI: 10.1159/000381343

Received: December 1, 2014
Accepted after revision: February 27, 2015
Published online: April 22, 2015

Regulation of B-Cell-Activating Factor Expression on the Basophil Membrane of Allergic Patients

Monica Boita^a Enrico Heffler^a Stefano Pizzimenti^a Alberto Raie^a Elona Saraci^b
Paola Omedè^b Claudia Bussolino^a Caterina Bucca^a Giovanni Rolla^a

^aDivision of Allergy and Immunology, Department of Medical Science, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano Umberto I, and ^bDivision of Hematology, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, University of Turin, Turin, Italy

Key Words

Allergic bronchopulmonary aspergillosis · *Aspergillus fumigatus* · B-cell-activating factor · Basophil · Basophil activation test · Fungal sensitization · IgE · Severe asthma · TLR-2

Abstract

Background: To investigate the modulation of B-cell-activating factor (BAFF) expression on the basophil membrane of allergic patients. BAFF is an important regulator of B-cell activation, proliferation and immunoglobulin production, which may play a role in respiratory allergic diseases in promoting the production of IgE by B cells. **Methods:** Peripheral blood samples of 10 patients with allergic rhinitis, 3 with severe asthma and fungal sensitization (SAFS), 3 with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and 11 healthy controls were assessed regarding BAFF (CD257) expression using the basophil activation test before and after stimulation with IgE and allergens, as well IgE-independent stimuli, like fMLP, lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* (LTA-SA) and lipopolysaccharide (LPS). **Results:** BAFF membrane expression did not change after IgE and allergen stimulation both in patients and controls, while it was upregulated by *Aspergillus* stimulation, both in sensitized patients and controls. In both patients and controls, BAFF expression was sig-

nificantly upregulated following LTA-SA and β -1,3-glucan exposure (toll-like receptor-2 ligands), but not following LPS stimulation. **Conclusions:** Basophils from allergic and healthy subjects constitutively express membrane BAFF, which is not upregulated by IgE or specific allergens but by TLR-2 ligands (LTA-SA and β -1,3-glucan). *Aspergillus fumigatus* stimulation was able to upregulate BAFF expression on the basophils of sensitized asthmatic patients, but not via IgE-dependent mechanisms, since results did not differ between the patient and control groups. These findings suggest that basophils may contribute to the polyclonal production of IgE commonly observed in patients with SAFS and ABPA.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

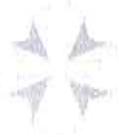
B-cell-activating factor (BAFF) is an important regulator of B-cell activation, proliferation and immunoglobulin production. It plays an important role in autoimmune diseases [1]. Recent observations indicate that BAFF may also play a role in respiratory allergic diseases [2]. Allergic rhinitis and asthma are characterized by the production of IgE specific for ubiquitous allergens (e.g. pollen, mites and molds); in some patients, an increase in total un-specific IgE may be observed, particularly in patients with

KARGER 125

© 2015 S. Karger AG, Basel
1616-2437/15/1663-0208\$39.50/0

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/ha

Correspondence to: Prof. Giovanni Rolla
Division of Allergy and Immunology, AO Mauriziano
Largo Turati 62
IT-10128 Torino (Italy)
E-Mail: grolla@mauriziano.it



tory cells and cells that are involved in pathways linking innate to adaptive immunity. Specifically, basophils may help to regulate the adaptive immune response because they are a known early source of IL-4 and other cytokines associated with Th2 responses [15]. Our finding that BAFF is constitutively expressed on the basophil membrane of allergic patients may have implications for the activation of immunoglobulin production and class switching recombination. Other cells, such as epithelial cells, may produce BAFF and participate in the promotion of local IgE production, as reported for chronic rhinosinusitis with nasal polyps [16], where sinonasal tissue BAFF mRNA expression was significantly correlated with CD20 expression [17].

The upregulation of BAFF expression on the basophil membrane that we observed following *Aspergillus* stimulation may be related to the huge amount of polyclonal IgE production that is commonly observed in patients with SAFS and to an even higher degree in ABPA patients, the airways of whom are colonized by *Aspergillus* [3, 4].

In conclusion, our results demonstrate that basophils constitutively express BAFF on their membranes, both in allergic and in healthy subjects, and are able to upregulate its expression through non-IgE-mediated stimulation. These findings suggest that basophils, like other cells of innate immunity, help to establish a link between innate and adaptive immune responses, specifically following TLR stimulation.

Acknowledgment

This study was supported by ASIMAS (Italian Association of Patients with Mastocytosis) and the 'Fondazione Scientifica Mauriziana' (a non-governmental, non-profit scientific foundation).

Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Schneider P, Mackay B, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999;188:1747-1756.
- Kato A, Qing Xian H, Chuartz RT, Liu MC, Schleimer RP: Local release of B cell-activating factor of the TNF family after segmental allergen challenge of allergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:369-375.
- Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer B, Niven RM: The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J* 2006;27:615-626.
- Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, Moss R, Denning DW: ABPA complicating asthma ISHAM working group: Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy* 2013;43:850-873.
- Fiset PO, Cameron L, Hamid Q: Local isotype switching to IgE in airway mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:233-236.
- Gould HJ, Takhar P, Harries HE, Durham SR, Corrigan CJ: Germinal-centre reactions in allergic inflammation. *Trends Immunol* 2006;27:446-452.
- Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengten E, Edholm E, Santini PA, Rath P, Chiu A, Cattalini M, Litman J, Bassel J, Huang B, Meiri A, Riesbeck K, Cunningham-Rundles C, Plebani A, Cerutti A: Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 2009;10:889-896.
- Watanabe T, Yamashita K, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Uza N, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T: Toll-like receptor activation in basophils contributes to the development of IgE-related disease. *J Gastroenterol* 2013;48:247-253.
- Mackay B, Schneider P: Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009;9:491-502.
- Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM: Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 2001;97:198-204.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;2:RESEARCH0034.
- MacGlashan D Jr: Marked differences in the signaling requirements for expression of CD203c and CD11b versus CD63 expression and histamine release in human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159:243-252.
- Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM: Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 2002;277:39320-39326.
- Asst LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M, et al: Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 2007;56:1776-1786.
- Chirumbolo S: State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve? *Blood Transfus* 2012;10:148-164.
- Small P, Barrett D, Frenkel S, Rochon I, Cohen C, Black M: Local specific IgE production in nasal polyps associated with negative skin tests and serum RAST. *Ann Allergy* 1985;55:736-739.
- Kato A, Peters A, Suh I, Carter R, Harris KE, Chandra R, et al: Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1385-1392.



Title: ICOS-Ligand expression on basophils membrane.

Boita M.¹, Dianzani U.², Omedè P.³, Bucca C.⁴, Rolla G.¹

¹Department of Medical Sciences - Allergy and Clinical Immunology, AO Mauriziano "Umberto I" Hospital, University of Torino, Torino, Italy

²Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont 'A Avogadro', Novara, Italy.

³Division of Hematology, A.O.U. Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy.

⁴Department of Medical Sciences - Respiratory Diseases, Città della Salute Hospital, University of Torino, Torino, Italy

Background

ICOS is related to the CD28 superfamily and is crucial for the survival and function of T cells, Th cell differentiation and lung inflammatory responses. ICOS ligand (ICOS-L), one of the five B7 family members, is expressed on professional antigen-presenting cells as well as on several types of non immune cells. Binding ICOS to ICOS-ligand activates a cascade of intracellular signaling molecules that prevents T cell apoptosis and induces production of several patterns of cytokines depending on the microenvironmental cytokine milieu. Very recently, it has been demonstrated that innate lymphocytes type 2 (ILC2) express ICOS and ICOS-L and the ICOS:ICOS-L interaction is required for efficient ILC2 function and provides a survival signal for ILC2. Whether basophils, cells of innate immunity, express ICOS or ICOS-L is not known.

Methods

The presence of ICOS and ICOS-L on basophils membrane was investigated by the Basophils Activation Test (BAT) in 5 subjects with allergic rhinitis and 6 healthy controls, before and after IgE, fMLP and ICOS stimulation.

Results

ICOS-L was equally expressed on basophils membrane of allergic and healthy subjects in baseline conditions (ICOS-L positive cells 4.75 ± 6.21 vs 6.74 ± 5.9 %, respectively), while ICOS was not expressed.

IgE and fMLP stimulations were able to increase ICOS-L expression, but not CD63 expression, on basophils of allergic and healthy subjects: from 4.75 ± 6.21 to 17.92 ± 12.7 % ($p=0.05$) and to 8.92 ± 7.27 ($p=0.04$) following IgE and fMLP stimulation respectively in allergic patients and from 6.74 ± 5.9 to 48.76 ± 44.16 % ($p=0.03$) and to 17.2 ± 17 ($p=0.05$) following IgE and fMLP stimulation respectively in healthy controls, with no significant differences between the two groups.

ICOS-L triggering with a Fab2-like soluble construct of ICOS obtained by fusing the extracellular portion of ICOS with the CH3 domain of IgG1 at different incubation times (20, 40 and 60 minutes) did not affect ICOS-L expression and did not induce CD63 up-regulation on basophils.

Conclusions

Basophils from healthy controls and allergic patients express ICOS-L on their membrane and the expression is upregulated by IgE stimulation. Binding ICOS to ICOS-L of basophils membrane does not induce basophils activation. Whether binding ICOS to ICOS-L of basophils membrane promotes cytokine production (i.e. IL-4) from basophils needs to be investigated.



ICOS-LIGAND EXPRESSION ON BASOPHILS MEMBRANE

Boira M¹, Dianzani U², Omedè P³, Bucca C⁴, Rolin G⁵

¹Department of Medical Sciences - Allergy and Clinical Immunology, AO Mauriziano "Umberto I" Hospital, University of Torino, Torino, Italy
²Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro" Novara, Italy
³Division of Hematology, A.O.U. Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy
⁴Department of Medical Sciences - Respiratory Diseases, Città della Salute Hospital, University of Torino, Torino, Italy



European Academy of
Allergy and Clinical Immunology
Congress
11-15 June 2016
Vienna, Austria



BACKGROUND

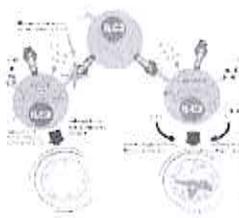
ICOS is related to the CD28 superfamily and is crucial for the survival and function of T cells and T helper cell differentiation.

ICOS ligand (ICOS-L), one of the five B7 family members, is expressed on professional antigen-presenting cells as well as on several types of non-immune cells.

Binding ICOS to ICOS-Ligand activates a cascade of intracellular signaling molecules that prevents T cell apoptosis and induces production of several patterns of cytokines depending on the micro environmental cytokine milieu.

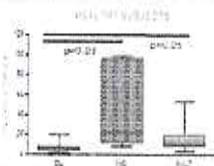
Very recently, it has been demonstrated that innate lymphocytes type 2 (ILC2) express ICOS and ICOS-L and the ICOS/ICOS-L interaction is required for efficient ILC2 function, providing a survival signal for ILC2.

Whether basophil, cells of innate immunity, express ICOS or ICOS-L is not known.



RESULTS (1)

- ICOS-L (and not ICOS) is expressed on basophil membrane both in allergic and healthy subjects.
- ICOS-L expression is significantly increased on basophil membrane following:
 - IgE stimulation in allergic ($p=0.05$) and healthy ($p=0.03$) subjects
 - fMLP stimulation in allergic ($p=0.04$) and healthy ($p=0.05$) subjects
- ICOS-L triggering with a Fab1-like soluble construct of ICOS obtained by fusing the extracellular portion of ICOS with the CH3 domain of IgG1 at different incubation times (20, 40 and 60 minutes) did not affect ICOS-L expression and did not induce CD63 up-regulation on basophils.



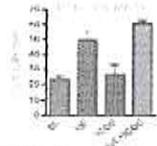
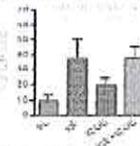
AIM and METHODS OF THE STUDY

The aim of the study was to investigate whether ICOS and/or ICOS-L are expressed on basophil membrane, whether ICOS-L may be upregulated following stimulation and if ICOS-L stimulation with soluble ICOS was able to induce basophil activation and IL-4 production.

ICOS, ICOS-L expression was investigated by flow cytometry using the Basophil Activation Test (BAT) in 7 subjects with allergic rhinitis and 6 healthy controls, before (BL) and after IgE, fMLP and ICOS stimulation. Intra-cytoplasmic IL-4 was investigated with BAT in only three allergic and healthy subjects, before and after IgE, ICOS and IgE-ICOS stimulation.

RESULTS (II)

- ICOS-L triggering with soluble ICOS alone was able to increase intra-cytoplasmic IL-4 both in allergic and healthy subjects, compared to baseline, with no significant differences between groups.
- ICOS-L triggering with soluble ICOS and IgE together induced an higher increase of intra-cytoplasmic IL-4, both in allergic and healthy subjects, compared to baseline, with no significant differences between groups.



CONCLUSIONS

Basophils from healthy controls and allergic patients express ICOS-L on their membrane and its expression is upregulated by IgE and fMLP stimulation.

Binding ICOS to ICOS-L on basophils membrane promotes IL4 production, but not basophils activation (CD63 upregulation).

Whether specific allergen stimulation together with binding ICOS to ICOS-L on basophils membrane of allergic patients promotes IL4 production needs to be investigated.

Supported by Fondazione Scientifica Mauriziana e Associazione Italiana Mastocitosi. In relation to this presentation, I declare that there are no conflicts of interest. *Maurizio Boira, maurizio.boira@unito.it*