

*Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”*



*Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare*

*Ciclo XXII*

*RELAZIONE 1° ANNO*

***TIMP-1 e OSTEOPONTINA NELLO  
SVILUPPO DELLA SINDROME  
AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA***

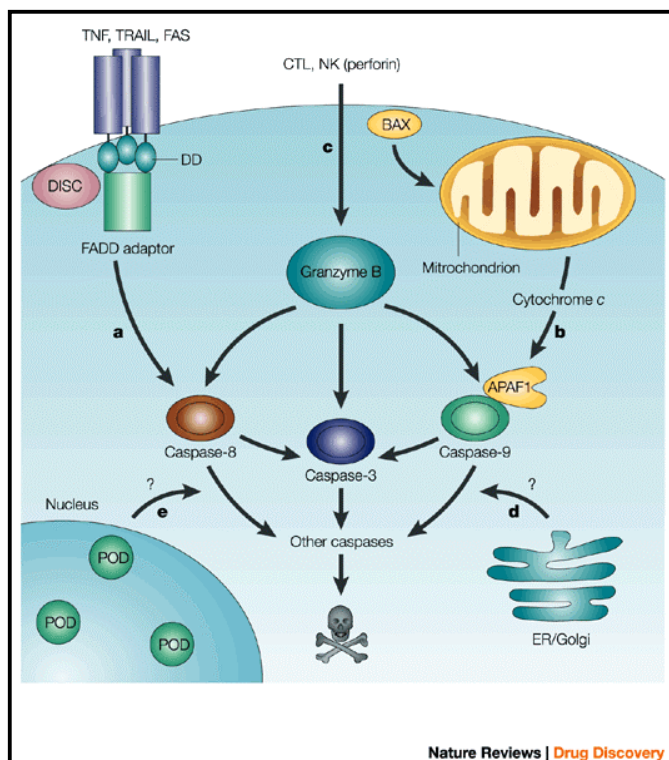
*Candidato:*  
Elena Boggio

*Responsabile scientifico:*  
Prof. Umberto Dianzani

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI.

A.



L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale sia nello sviluppo delle cellule degli organi linfoidi primari, che nella regolazione della risposta immunitaria delle cellule mature. Una delle caratteristiche del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *non-self*, facendo in modo che si sviluppi una risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e favorendo la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come *tolleranza al self*). Nel caso di

una mancata tolleranza segue una risposta immune verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni.

I processi fondamentali che richiedono una corretta morte cellulare programmata sono la maturazione dei linfociti B e T nel midollo osseo e nel timo, il controllo dell'attivazione e dello spegnimento della risposta immune e lo sviluppo di attività effettrici, come l'attività citotossica (Nat R. et. al.,2002).

Lo sviluppo dei linfociti T non è regolato solo dalla proliferazione e dal differenziamento ma anche da una corretta apoptosi. Infatti l'attivazione dei linfociti a cellule effettrici deve essere antigene specifica e deve essere limitata nel tempo: dopo che l'antigene è stato eliminato, i linfociti devono andare incontro a morte cellulare programmata.

Anche i timociti che compiono uno scorretto processo di riarrangiamento del TCR (*T-cell receptor*) o riconoscono antigeni *self*, sono eliminati per apoptosi: processo noto come *selezione negativa*.

Lo spegnimento della risposta immunitaria è essenziale per garantire una protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self* e scatenino una reazione autoimmune (Peng Y. et. al.,2007).

L'apoptosi può essere indotta attraverso due vie principali: la via estrinseca innescata da specifici recettori di morte espressi sulla membrana cellulare e la via intrinseca, che agisce a livello del mitocondrio. I recettori di morte trasmettono segnali apoptotici grazie al legame con uno specifico ligando (Ashkenazi A. et. al.,1998).

Un'altra forma di apoptosi attraverso la quale i linfociti T attivati vanno incontro a morte è l'AICD (*Activation Induced Cell Death*).

L'AICD è coinvolta nella tolleranza periferica controllando l'espansione dei linfociti T stimolati attraverso la via apoptotica dipendente da Fas. In periferia i linfociti T se continuamente stimolati dal TCR vanno incontro a AICD, risultato dell'interazione tra il recettore Fas e il suo ligando.

Mutazioni a carico di Fas o del suo ligando sono note indurre lo sviluppo di malattie autoimmuni nel topo e nell'uomo (Siegel RM. et. al.,2000).

*A. Rappresentazione schematica della via estrinseca e intrinseca dell'apoptosi.*

### **1.1.2 IL SISTEMA FAS/ FAS LIGANDO (FasL).**

Fas (CD95/Apo1) è una glicoproteina transmembrana di 45-48 Kd. Esso è un recettore della superficie cellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), una vasta famiglia di recettori coinvolti nello sviluppo e nella maturazione dei linfociti. Una classificazione di questa famiglia individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e per questo chiamati recettori di morte. I recettori di morte comprendono, oltre a Fas, il TNFR1, il TNFR2, il recettore per la linfotossina, quello per il nerve growth factor (NGF), le molecole CD30, CD27, CD40 e i recettori di TRAIL (*TNF-related- apoptosis-inducing-ligand*).

Il sistema Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. Esso rappresenta uno dei meccanismi attraverso il quale i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio: essi esprimono infatti elevati livelli di FasL che, interagendo con Fas espresso sulla superficie delle cellule bersaglio, innescano la morte cellulare programmata di quest'ultime. Inoltre i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL.

Il recettore Fas è costituito da una porzione extracellulare ricca di cisteine, in grado di legare il suo ligando, da una regione transmembrana e da una intra-cellulare, che contiene il *death domain* (DD), che interagendo con la proteina FADD (*Fas Associated Death Domain*) trasduce il segnale di morte. Il legame di Fas con il suo ligando porta alla trimerizzazione del recettore inducendo la formazione del DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), costituito

dall'associazione tra Fas, la molecola adattatrice FADD e la pro-caspasi 8. L'attivazione della caspasi 8 effettrice innesca una cascata proteolitica attivatoria che coinvolge la caspasi 10. Le caspasi 8 e 10 attivano le caspasi esecutrici 3, 7 e 6 (Nagata S. et. al.,1997; Los M. et. al., 2001).

L'apoptosi può essere innescata anche attraverso la via intrinseca. Il citocromo c è la molecola chiave di questa via; esso viene rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il citocromo c si lega successivamente alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) che, legando la pro-caspasi 9, porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma, il quale induce l'attivazione della caspasi 9 (Green DR. et. al.,1998; Kroemer G. et al.,1995).

Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che attivano il loro substrato per proteolisi a livello di un residuo specifico di acido aspartico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare. Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di pro-enzimi inattivi, che vengono attivati mediante l'eliminazione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione può essere autocatalitica o mediata da un'altra caspasi (Kumar S. et. al.,1999). L'acquisto della sensibilità all'apoptosi da parte dei linfociti T non solo correla con l'espressione di Fas, ma dipende anche dalla *downregulation* di proteine anti-apoptotiche come ad esempio FLIP (*FLICE- inhibitory proteins*). FLIP inibisce l'apoptosi indotta da Fas e da altri recettori di morte modulando l'attività del DISC.

Topi *knock-out* per Fas o Fas ligando sviluppano disordini linfoproliferativi associati ad autoimmunità, suggerendo un ruolo critico della morte cellulare mediata da Fas nelle malattie autoimmuni (Rieux-Laucat F. et. al.,2003).

In definitiva, l'apoptosi ha lo scopo di impedire che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self*.

### **1.2.1 LE MALATTIE AUTOIMMUNI.**

Le malattie autoimmuni, fatta eccezione per la tiroidite autoimmune e l'artrite reumatoide, colpiscono circa il 5% della popolazione dei paesi occidentali. Sono il prodotto di un'attivazione dei linfociti T o B in assenza di una causa documentabile, scatenando autoreattività. La perdita della tolleranza al *self* genera risposte immuni verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni.

Una caratteristica del sistema immunitario è la capacità di regolare la risposta immunitaria; in particolare quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della gran parte dei

linfociti attivati, fenomeno noto come “*spegnimento della risposta immunitaria*”. Questo processo è essenziale per garantire protezione nei confronti dell’autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c’è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self*. Tuttavia una piccola porzione di essi non muore ma permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene (Tsonis IA. et. al.,2007).

L’autoreattività in parte è fisiologica; la sfida è quella di conoscere come questa diventi un processo patologico e come i linfociti T e B contribuiscano alla patogenesi delle malattie autoimmuni. Dal momento che linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia.

Un difetto dell’apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. In primo luogo le cellule apoptotiche esprimono in membrana autoantigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti nel tempo. Oppure alterazioni del processo apoptotico possono scatenare fenomeni necrotici che, a differenza dell’apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono la presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono anche gli agenti infettivi, spesso di tipo virale, i fattori ambientali, il sesso e la perdita delle cellule regolatorie.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi: la presenza di antigeni virali simili ad antigeni *self*, può determinare una “cross-reazione” contro il *self*, oppure l’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che sono erroneamente riconosciuti come *non self*. Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto “*mimetismo o mimicria molecolare*”. Per esempio nella sindrome di Guillain Barrè è stata dimostrata reattività crociata degli anticorpi verso il lipopolisaccaride di *C. jejuni* e i gangliosidi umani (Kuijf ML., et. al., 2007).

Anche i fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni anche se spesso il fattore ambientale scatenante resta ignoto. Inoltre, anche il sesso femminile è un fattore predisponente lo sviluppo di malattie autoimmuni: è stato dimostrato che la produzione massiva di estrogeni nella donna altera alcune funzioni dei linfociti B. Infine, anche alterazioni nel numero e nella funzionalità dei linfociti T regolatori CD4/CD25 positivi contribuiscono all’autoimmunizzazione.

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni si dividono in sistemiche, come ad esempio la sindrome autoimmune linfoproliferativa e il lupus eritematoso sistemico, e organo-specifiche, come ad esempio il diabete mellito di tipo 1, la sclerosi multipla e la tiroidite di Hashimoto. Dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da cellule, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

La maggior parte delle malattie autoimmuni sono multifattoriali, ovvero sono causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali. Un'adeguata conoscenza dei geni e dei meccanismi funzionali coinvolti nell'autoimmunità permetterebbe di sviluppare terapie e piani di prevenzioni innovativi.

### **1.2.2 LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS).**

La sindrome autoimmune linfoproliferativa, è una malattia autoimmune dell'infanzia, originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith (Canale VC et. al.,1967).

È caratterizzata da un disordine dell'omeostasi dei linfociti causata da un difetto dell'apoptosi, dall'accumulo di linfociti nella milza e nei linfonodi e da espansione clonale di linfociti T doppi negativi (DN) CD4/CD8, TCR  $\alpha\beta$  positivi (Straus S. E. et. al.,1999; J. J. H. Bleesing et. al.,2001). Il nostro laboratorio ha identificato un piccolo numero di pazienti, in origine identificati come ALPS, che presentano tutte le condizioni cliniche dei pazienti con ALPS, tranne l'espansione dei linfociti T DN. Successivamente, McKusick propose di usare il termine DALD (*Dianzani's Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*) per indicare questi pazienti ed evitare confusione (McKusick VA, OMIM:%605233).

Il tratto principale dei pazienti con ALPS è la linfoproliferazione in combinazione a linfadenopatia e massiva splenomegalia.

La diagnosi di ALPS viene eseguita in base alla presenza di linfadenopatia non maligna, splenomegalia, presenza di linfociti T DN circolanti superiori all' 1%, difetti dell'apoptosi da parte di linfociti attivati *in vitro* (Lopatin U. et, al.,2001). Spesso in aggiunta, sono riscontrabili altre malattie autoimmuni, una storia familiare positiva per l'ALPS e mutazioni a carico del gene per Fas (Campagnoli MF. et. al.,2006; Martin DA. et. al.,1999).

L'unico trattamento farmacologico per l'ALPS è la somministrazione di corticosteroidi o altri immunosoppressori anche se, a lungo termine, sono molteplici gli effetti collaterali.

Poiché l'ALPS è stata recentemente identificata non sono disponibili *follow-up* a lungo termine per valutarne la prognosi; tuttavia diversi pazienti sviluppano nel tempo tumori ematologici e severe malattie autoimmuni (van den Berg A. et. al.,2002).

Fino ad oggi sono state identificate quattro varianti dell'ALPS classificate in base al difetto genetico:

ALPS Ia con mutazioni a carico del gene di Fas,

ALPS Ib con mutazioni a carico del gene di Fas ligando,

ALPS II con mutazioni a carico del gene di caspasi 10 o 8.

Tuttavia ancora sono molti i casi di ALPS in cui non si conosce il difetto genetico, identificati come ALPS III. Recentemente è stata identificata una forma della malattia con mutazioni a carico del gene di N-Ras, denominata ALPS IV (Oliveira B. et. al.,2007).

Il modello animale dell'ALPS è rappresentato dai topi MRL *lpr* e *gld*, modello murino dell'autoimmunità, portatori di una mutazione "loss of function" in omozigosi, rispettivamente nei geni di Fas e FasL. La tipica mutazione *lpr* è causata da un difetto di splicing e determina una ridotta espressione del recettore in membrana, mentre una variante della mutazione, la forma *lpr<sup>cg</sup>* è una mutazione puntiforme nel *Death Domain* (DD) del recettore Fas che ne riduce l'attività. La mutazione *gld* è invece una mutazione puntiforme nel dominio C-terminale di FasL che ne riduce la capacità di interagire con Fas (Benihoud K. et. al.,1997).

Sulla base di precedenti studi sulle caratteristiche immunologiche dei pazienti con ALPS, si è visto che essi presentano una risposta preferenziale di tipo T-helper 2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- $\gamma$  e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1, favorendo indirettamente la linea Th2 (Renkl AC. et. al.,2005).

Nell'ALPS esiste una grande variabilità clinica, non solo tra pazienti con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione in Fas. Mutazioni autosomiche recessive sono state descritte in un moderato numero di pazienti con ALPS, nei quali entrambi gli alleli per Fas sono mutati. La forma della malattia associata a eterozigosi spesso è poco chiara dato che l'individuo eterozigote portatore della mutazione non mostra segni clinici. Infatti nell'ALPS-Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non è sufficiente per lo sviluppo della malattia (Jackson C. E. et. al.,1999).

L'espressione della malattia quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più alterazioni geniche (Ramenghi U. et. al.,2000). La variabilità nei meccanismi di eredità fa supporre il coinvolgimento di diversi fattori nell'eziopatogenesi dell'ALPS. In particolare il nostro laboratorio si è focalizzato sul coinvolgimento di osteopontina e TIMP-1 nello sviluppo di questa malattia autoimmune.

### 1.3 OSTEOPONTINA (OPN).

OPN è una glicoproteina acida fosforilata a livello di diversi residui di serina e implicata in diversi eventi fisiologici e patologici tra i quali rimodellamento osseo, infiammazione, cancro, angiogenesi, patologie cardiovascolari e malattie autoimmuni (Denhardt DT. et. al.,2001; Ellen M. et. al.,2003; Mazzali M. et. al.,2002; Naldini A. et. al.,2006). Fu inizialmente identificata come la più abbondante sialoproteina presente nel tessuto osseo (Prince CW. et. al.,1987). OPN è stata isolata per la prima volta dal tessuto osseo murino, umano e bovino e successivamente ritrovata anche nella placenta, nel tessuto renale, nel muscolo liscio e nei leucociti.

La fonte principale di OPN sono gli osteoblasti e gli osteociti ma è anche abbondantemente espressa dai linfociti T e B attivati, infatti fu identificata come Eta-1 (*early T-cell activation*), dai monociti-macrofagi, dalle cellule NK (natural killer) e dalle cellule dendritiche.

OPN è codificata da un gene multiallelico, localizzato nell'uomo sul cromosoma 4q21-q25, formato da 7 esoni e 6 introni. Il suo peso molecolare varia tra 25 e 80 kDa, in base ai processi post-trascrizionali ai quali è sottoposta, tra cui glicosilazione, fosforilazione e clivaggio ad opera della trombina, a livello dei residui R<sup>168</sup> S<sup>169</sup>. In particolare in seguito al taglio proteolitico operato dall trombina, OPN espone la sequenza peptidica SVVYGLR, importante per promuovere l'adesione delle cellule che esprimono le integrine  $\alpha 9$  e  $\alpha 4$ . OPN subisce tagli proteolitici anche da parte delle metalloproteasi della matrice (MMPs), in particolare dalla MMP-3 e MMP-7.

Inoltre OPN possiede una sequenza tripeptidica "Arginino-Glicina-Aspartato" (RGD) a livello della quale può essere abbondantemente glicosilata. OPN attraverso il dominio RGD è in grado di interagire con le integrine, quali  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$ , favorendo l'aderenza di diversi tipi cellulari. Il legame con le integrine media l'adesione di linfociti B, piastrine, osteoclasti, cellule del muscolo liscio e l'aumentata espressione di IL-12 da parte dei macrofagi. È stato dimostrato che il legame di OPN con l'integrina  $\alpha v\beta 3$  media la migrazione di cellule endoteliali durante l'angiogenesi (Senger DR. et. al., 1996; Mitsiades N. et. al.,2001).

OPN è in grado di interagire con diverse isoforme di CD44, in particolare CD44<sub>v6-7</sub> (Denhardt DT. et. al.,2001;O'Regan A. et. al.,2000) favorendo la secrezione di IL-12 e inibendo la produzione di IL-10. Entrambi i recettori polarizzano comunque i linfociti T verso una risposta di tipo-1. La polarizzazione dei linfociti T helper in senso Th1 o Th2, aspetto critico dell'immunità cellulo-mediata, è influenzata dalla produzione di alcune citochine tra le quali OPN (Ashkar S. et. al.,2000).



È noto che OPN viene prodotta dai linfociti T nelle prime fasi di attivazione e che recluta e attiva i macrofagi a livello del sito infiammatorio. *In vivo*, la somministrazione subcutanea di OPN induce richiamo locale di macrofagi (Rollo EE. et al.,1996). Questo è mediato dall'estremità C-terminale della proteina, che si crea dopo il taglio proteolitico mediato dalla trombina, mentre il legame con il recettore CD44 a livello dell'estremità N-terminale promuove la chemotassi e l'attivazione dei macrofagi (Lin YH. et. al.,2001).

Sono state identificate tre isoforme di OPN che si generano in seguito a splicing alternativo: OPNa di 945bp che codifica per la proteina intera, OPNb di 903 bp che presenta una delezione di 14 aminoacidi nell'esone 5 e OPNc di 864bp che presenta una delezione di 28 aminoacidi nell'esone 4 (Young MF. et al, 1990; Giacomelli F. et. al.,2004).

OPN esiste come proteina immobilizzata facente parte della matrice extracellulare e come citochina nei fluidi biologici, agendo come importante componente dei processi infiammatori e della risposta immunitaria (Standal T. et. al.,2004).

Sebbene identificata nel 1985, il suo coinvolgimento nel processo infiammatorio e nella risposta immunitaria è stato descritto solo negli ultimi anni. Diversi mediatori dell'infiammazione, come TGF- $\alpha$  e IL-1, inducono la trascrizione di OPN, attraverso l'attivazione di PKC (*protein kinase C*) (Denhardt DT. et. al.,2001).

OPN è una molecola con un duplice ruolo, pro ed anti-infiammatorio. Per quello che riguarda la sua azione pro infiammatoria, agisce come agente chemoattrattivo, favorisce l'adesione dei macrofagi e modula la funzione di macrofagi e linfociti T *in vitro* (O'Regan A. et al.,1999). Nel topo, OPN costimola i macrofagi, attivati da lipopolisaccaride, a produrre IL-12 ed inibisce la produzione di IL-10. In linea con quest'osservazione, topi *knock out* per OPN rispondono ad infezioni, normalmente caratterizzate da una risposta di tipo Th1, con una ridotta produzione di IL-12 e una aumentata produzione di IL-10 (O'Regan AW et al,2000; Hashimoto M. et., al.,2007).

OPN controlla la proliferazione dei linfociti T, infatti li stimola a differenziarsi, favorisce la produzione di INF- $\gamma$  e l'espressione di CD40L, con conseguente espressione di IL-12 e produzione di anticorpi da parte dei linfociti B (O'Regan AW et al, 2000). Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione Foxo3a (*forkhead box O3*) e NFkB (*nuclear factor-kappa B*) (Hur EM. et. al.,2007).

Per quanto riguarda la sua azione anti-infiammatoria poco è conosciuto, ma si pensa che OPN eserciti un effetto anti-infiammatorio inibendo la produzione di ossido nitrico, inibendo l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) (Guo H. et. al.,2001; Takahashi F. et. al.,2000). Inoltre

recentemente è stato dimostrato che OPN ha un effetto anti-infiammatorio durante la seconda esposizione con l'antigene, in corso di episodi allergici (Xanthou G. et. al.,2007).

OPN svolge un ruolo fondamentale anche nello sviluppo dei tumori esercitando i suoi effetti pro-metastatici interagendo con le integrine e con CD44. L'interazione tra OPN e CD44 aumenta la formazione di foci, l'invasione e la tumori genesi, attraverso la via del segnale mediata dalla protein chinasi Rac. Diversi studi hanno dimostrato che OPN protegge le cellule tumorali dall'apoptosi attivando la via di sopravvivenza di PI3 chinasi-Akt (Rangaswami H. et.al.,2006).

OPN è iperespressa in diversi tipi di tumore tra i quali tumore alla mammella, alla prostata, osteosarcomi, glioblastomi e melanomi (Rittling SR. et. al.,2004). Topi *knockout* per il gene di OPN mostrano una ridotta capacità di formare colonie in *soft agar* e una più lenta comparsa del tumore *in vivo*. Il silenziamento genico di OPN nel topo, mediante la tecnica dell'RNA interference, ha dimostrato una soppressione dello sviluppo di adenocarcinoma al colon sia *in vitro* che *in vivo* (Wai PT. et. al.,2004).

Una sregolata espressione di OPN è legata a severe malattie autoimmuni (Agnholt, J. et. al.,2007) e malattie cardiovascolari (Zohar R. et. al.,2004).

Il ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni può essere in parte spiegato con la sua azione pro-infiammatoria, che prevede il reclutamento di leucociti nel sito di infiammazione e la polarizzazione in senso Th-1. Lo studio svolto su topi transgenici per OPN (OPN<sup>+/+</sup>) ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associati alla produzione di autoanticorpi, ipergammaglobulinemia ed elevati livelli sierici di autoanticorpi (Masutani K. et al,2001).

Ad esempio elevati livelli di OPN sono stati rilevati a livello delle lesioni cerebrali in pazienti affetti da sclerosi multipla. Infatti il topo *knock-out* per OPN sviluppa una forma più lieve di EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale), modello sperimentale della sclerosi multipla, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type* (Blom, T. et. al.,2003; Hur EM. et. al.,2007).

Nell'artrite reumatoide l'espressione di OPN è elevata nei fibroblasti, nei macrofagi e nei liquidi sinoviali, dove inibisce la produzione di ossido nitrico e di prostaglandina E<sub>2</sub>. Il topo *knock-out* per OPN mostra protezione dall'artrite reumatoide, confermando il ruolo di OPN nella patogenesi della malattia (Mishima R. et. al.,2007).

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo di autoimmunità nell'uomo sono molteplici (L. Bird,2007) e lo studio dei polimorfismi di OPN ha portato ad interessanti associazioni con alcune malattie autoimmuni.

Il cDNA di OPN presenta 11 polimorfismi, 1 nell'esone VI e 10 nell'esone VII (in particolare 2 nella regione codificante e 8 al 3'UTR).

Analisi genetiche, condotte nel nostro laboratorio, a carico del cDNA di OPN, hanno identificati alcuni polimorfismi che formano tre aplotipi (A, B e C). È stato dimostrato che i portatori dell'aplotipo B e/o C hanno un rischio 8 volte maggiore di sviluppare ALPS, rispetto agli individui omozigoti AA (Chiocchetti A. et al.,2004). Nel caso di sclerosi multipla il genotipo non AA conferisce il rischio di sviluppare la malattia di 1.5 volte maggiore, rispetto al genotipo AA (Chiocchetti A. et. al.,2005). Anche due singoli polimorfismi presenti nella regione 3' e 5' UTR del gene di OPN sono coinvolti nello sviluppo della suscettibilità al lupus eritematosus sistemico (D'Alfonso S. et. al., 2005).

Lo studio svolto su topi transgenici che producono elevati livelli di OPN ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di linfociti B1, ipergammaglobulinemia ed elevati livelli sierici di autoanticorpi, fenotipo che richiama il quadro autoimmune/linfoproliferativo e la correlazione diretta tra i livelli di OPN e l'ipergammaglobulinemia dei pazienti con ALPS.

#### **1.4. TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1).**

La famiglia degli inibitori delle metalloproteinasi è costituita da 4 membri (TIMP 1-4), i quali regolano il *turnover* delle proteine e il rimodellamento della matrice extracellulare, formando dei complessi stechiometrici reversibili 1:1 con le MMPs. In particolare TIMP-1 inibisce in maniera specifica le MMP-7 e 9 (Avalos BR. et. al.,1988; Visse R. et. al.,2003).

Le MMPs sono importanti in diversi processi biologici normali, come lo sviluppo embrionale, l'angiogenesi e il riparo delle ferite, ma sono coinvolte anche in diversi processi patologici come l'infiammazione e l'autoimmunità (Goetzl EJ. et. al.,1996). TIMP-1 è stato scoperto circa venti anni fa come attivatore e potenziatore della linea eritroide, infatti è in grado di stimolare la crescita e il differenziamenti dei precursori eritroidi murini e di cellule leucemiche K562. Le sue proprietà di regolatore della crescita sono state in seguito dimostrate nei processi fibrotici (Lambert E. et. al.,2003).

I geni che codificano per queste proteine sono localizzati sul cromosoma Xp11.1- p11.4, 17q25, 11q12.1-13.2 e 3p25, rispettivamente. Il gene che codifica per TIMP-1, in particolare, è costituito da 6 esoni per un totale di 3 Kb e codifica per una proteina di 206 amminoacidi di circa 23 KDa (Baker AH. et. al.,2002).

TIMP-1 è una glicoproteina che presenta un dominio N- e C- terminale (125 e 65 amminoacidi, rispettivamente) contenete ciascuno sei residui di cisteina conservati, in grado di formare tre ponti di solfuro. L'estremità N-terminale presenta elevata omologia tra i quattro

membri ed è sufficiente ad inibire le MMPs. Questa sequenza contiene dei residui in grado di interagire con lo ione zinco del sito attivo delle MMPs. Il dominio C terminale invece è importante per l'interazione proteina-proteina e il legame alle pro-MMPs, al fine di regolare il processo di attivazione (Visse R. et. al.,2003).

TIMP-1 è espresso dalle piastrine, dai monociti, dai neutrofili, dai linfociti T e B e dai fibroblasti; la sua espressione è stimolata da diversi agenti quali: TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , esteri del forbolo, retinoidi e prostaglandina E2. (Baratelli FE. et. al.,2004). IL-10 stimola la produzione di TIMP-1 in particolare nei fibroblasti e nei macrofagi polmonari (Lacraz et. al.,1995).

Non è ancora noto un recettore per TIMP-1 anche se recentemente è stata identificata, mediante il sistema del doppio ibrido in lievito, una proteina in grado di interagire con TIMP-1: CD63 (Chirco R. et. al.,2006).

CD63 è un membro della famiglia delle tetraspannine, le quali interagiscono con diverse proteine quali integrine, immunoglobuline e recettori per fattori di crescita. È stato dimostrato, in cellule epiteliali umani, che TIMP-1 legando CD63 forma un complesso con l'integrina  $\beta$ 1 sulla superficie cellulare. A questo segue l'attivazione di una via di sopravvivenza che, coinvolgendo le chinasi Fak (*Focal adesion kinase*) e Src, porta alla fosforilazione della proteina chinasi Akt/PKB. A questi eventi segue la fosforilazione di Bad, membro pro-apoptotico della famiglia di Bcl-2, il quale non interagendo con Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> ne permette l'attivazione e quindi l'inibizione dell'apoptosi. In parallelo si attivano vie della trasduzione del segnale che coinvolgono fattori di sopravvivenza, quali Erk1,2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1,2*) e MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Jung KK. et. al.,2006).

Uno studio recente riporta una aumentata espressione di CD63 nei linfociti T attivati ed è stato ipotizzato che CD63 possa funzionare da molecola co-stimolatoria e trasmettere segnali di sopravvivenza, quando stimolata da un anticorpo anti-CD63 (Pfistershammer K. et. al.,2004).

TIMP-1 è implicato in diversi processi biologici quali rimodellamento tissutale, inibizione dell'angiogenesi, modificazioni morfologiche delle cellule della matrice, stimolazione della steroidogenesi e regolazione dell'apoptosi.

A livello del sistema nervoso centrale (SNC), TIMP-1 svolge un ruolo neuroprotettivo grazie al mantenimento della barriera emato-encefalica, in particolare inibisce gli influssi di calcio glutammato-dipendenti, che si verificano in seguito agli insulti esocitotossici (Ogier C. et. al.,2005). È noto che gli stimoli pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o LPS inducono l'espressione di questa proteina negli astrociti e nelle cellule endoteliali di topi affetti da EAE. (Crocker SJ. et. al.,2006).

È stata dimostrata l'iper-espressione di TIMP-1 nei neurinomi e nei meningiomi il quale, contrastando l'effetto della MMP-9, ne migliora la prognosi (Kachra Z, et. al.,1999).

Recentemente è stato identificato il ruolo di TIMP-1 nell'infiammazione: in particolare controlla la proliferazione, la sopravvivenza e l'apoptosi cellulare, rallentando la degradazione dei tessuti (Chromek M. et. al.,2004).

Il topo *knock-out* per TIMP-1 è vitale anche se presenta ridotta fertilità. Inoltre mostra maggiore resistenza alle infezioni, un aumento della reazione infiammatoria e dell'attività del complemento, rispetto al fenotipo *wild-type*, a dimostrazione del fatto che TIMP-1 è necessario per attenuare la risposta infiammatoria (Jourquin J. et. al.,2005).

TIMP-1 svolge diverse funzioni biologiche indipendenti dalla sua capacità di inibire le MMPs, tra le quali regolazione della proliferazione, sopravvivenza cellulare e differenziamento di diversi tipi cellulari.

È nota in letteratura la proprietà anti-apoptotica di TIMP-1 indipendente dalla sua capacità di inibire le MMPs, influenzando sia la via intrinseca che quella estrinseca dell'apoptosi.

TIMP-1 inibisce l'apoptosi in: cellule stellate epatiche, cellule della linea eritroide, cellule di linfoma di Burkitt e cellule di tumore alla mammella umane (Guedez L. et. al.2005; Guedez L. et. al.,1998; Li G. et. al.,1999).

In queste ultime è stato descritto un meccanismo anti-apoptotico mediato da TIMP-1, che prevede l'inibizione dell'espressione di TRAIL, (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), sfuggendo così alla sorveglianza immunitaria (Liu X-W et. al.,2005; Okuyama S. et. al.,2005). Infatti è noto che TRAIL è un fattore che favorisce l'attività citotossica, mediata dalle cellule NK attivate e dai linfociti T, contro le cellule tumorali. Quindi l'inibizione dell'apoptosi mediata da TRAIL da parte di TIMP-1 gioca un ruolo fondamentale nell'inibizione della progressione del tumore. Sempre in questo tipo cellulare TIMP-1 riduce il tasso di crescita inducendo un arresto del ciclo cellulare nella fase G1, associato ad una *downregulation* della ciclina D1 e all'*upregulation* di p27<sup>KIP1</sup>, con conseguente inibizione dell'attività della chinasi associata alla ciclina (CDK) (Taube ME., et. al.,2006).

È stato descritto il ruolo di TIMP-1 come fattore di crescita delle cellule di linfoma di Burkitt; in questo tipo di linfoma l'espressione di TIMP-1 induce l'espressione di Bcl-X<sub>L</sub> e correla con un'elevata produzione di IL-10, la quale funziona da agente autocrino stimolando la proliferazione e la produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B (Guedez L. et. al.,1998). Anche nei monociti e nei macrofagi è nota la capacità di TIMP-1 di indurre la produzione di IL-10.

In cellule di linfoma di Hodgkin/Reed-Sternberg, che producono TIMP-1, questo funziona da fattore di sopravvivenza. Infatti è stato dimostrato che TIMP-1 ricombinante, inibisce la citotossicità linfocita T mediata, contro cellule tumorali autologhe presentanti l'antigene (Oelmann E. et. al.,2002).

Ancora, in cellule di carcinoma epiteliale, TIMP-1 induce l'espressione di Bcl<sub>2</sub>, noto inibitore della via intrinseca dell'apoptosi, in seguito ad una attivazione costitutiva di Fak. Invece nei linfociti B, inibisce l'apoptosi inducendo l'espressione di Bcl-X<sub>L</sub> e regolando l'espressione di CD40, CD77 e CD23 (Guedez L. et. al.,1998).

È stato proposto un meccanismo che prevede la traslocazione nel nucleo di TIMP-1, il quale potrebbe controllare positivamente la trascrizione di geni anti-apoptotici, anche se il meccanismo è ancora poco chiaro (Gaudin P. et. al.,2000; Ritter LM., et. al.,1999).

Anche se non è ancora chiaro il ruolo di TIMP-1 nell'autoimmunità, dati in letteratura hanno descritto il suo coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni.

L'iperespressione di TIMP-1 in celluleβ del pancreas ha dimostrato una significativa riduzione dell'apoptosi di queste cellule, indotta da ripetute dosi di streptozotocina, indicando che TIMP-1 può essere un potenziale target per prevenire o migliorare il diabete mellito di tipo 1 (Jiang H.et. al.,2007).

È stato dimostrato inoltre, che i PBMC di pazienti affetti da LES (lupus eritematoso sistemico), secernono TIMP-1 e come questo gioca un ruolo importante nel ridurre l'infiammazione e il danno tissutale, inibendo la MMP-9, con un conseguente aumento di IL-10 (Matache C. et. al.,2003).

Ozenci et al hanno dimostrato un aumento dell'mRNA di TIMP-1 nei PBMC di pazienti affetti da sclerosi multipla il quale, contrastando l'effetto delle MMP-9 potrebbe ridurre il danno alla barriera emato-encefalica (Ozenci V., et. al.,1999).

Questi dati hanno suggerito un possibile ruolo di TIMP-1 in una malattia autoimmune, come ad esempio l'ALPS, in quanto in questi pazienti è noto il difetto apoptotico dei linfociti, è riscontrata un'elevata produzione di IL-10 nel siero ed è frequente lo sviluppo di linfomi.

## **2. SCOPO DEL LAVORO.**

Questo lavoro valuta il coinvolgimento di osteopontina e TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS. Utilizzando un macroarray a cDNA è stata rilevata l'iperespressione dell'mRNA di OPN e TIMP-1, in una paziente con ALPS. Per generalizzare il dato ottenuto, sono stati valutati i livelli sierici di OPN e TIMP-1 in altri pazienti con ALPS e nei controlli sani. Al fine di spiegare gli elevati livelli di OPN sono state condotte analisi genetiche del cDNA di OPN. Data la concomitante elevata espressione di OPN e TIMP-1 nei pazienti con ALPS, è stata ricercata una correlazione diretta tra i livelli di OPN e TIMP-1 nei pazienti.

Dal momento che non sono stati identificati polimorfismi significativi nel gene di TIMP-1, correlati allo sviluppo della malattia, è stato valutato se OPN ricombinante (rOPN) ne induce la produzione nei PBMC. In seguito è stato valutato se l'attivazione dei linfociti T, tramite stimolazione del TCR, in presenza di un anticorpo anti-CD3, influenzi la produzione di TIMP-1.

Infine, abbiamo verificato quali popolazioni cellulari sono responsabili della produzione di TIMP-1, dopo stimolazione con rOPN, in particolare su monociti, cellule dendritiche e macrofagi.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 PAZIENTI.**

La diagnosi di malattia dei pazienti con ALPS si è basata sui seguenti criteri:

citopenia di origine autoimmune che coinvolge una o più linee di cellule ematiche, linfadenopatia cronica non maligna (aumento di almeno 2cm di diametro di due o più linfonodi) e/o splenomegalia, difetto di apoptosi indotta da Fas *in vitro*.

I campioni di siero e di sangue sono stati prelevati dai controlli, dai pazienti e dai loro parenti, con il loro consenso scritto e informato. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida proposte dalla commissione etica locale.

#### **3.2 SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO (Ficoll).**

Per la separazione di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC: Perypheral Blood Mononuclear Cell), è stato utilizzato sangue di donatori sani ottenuto da una sacca di sangue concentrato (Buffy coat), proveniente dal centro trasfusionale AVIS di Novara.

Il sangue è stato diluito con PBS, stratificato su 10 ml di Lympholyte (Cederlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada) e centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti .

In seguito sono stati recuperati i PBMC, lavati con PBS e centrifugati una seconda volta a 1500 rpm per 10 minuti.

Le cellule sono state risospese in terreno RPMI 1640 (Gibco, New York, USA) addizionato di 1% L-Glutamina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA). Le cellule sono state contate mediante colorante Blu di Tripano.

#### **3.3 SEPARAZIONE DI MONOCITI DA PBMC.**

Per l'arricchimento della frazione monocitaria è stata sfruttata la capacità dei monociti di aderire alla plastica. In particolare, i PBMC ottenuti dopo separazione su gradiente di densità sono stati portati ad una concentrazione di  $7.5 \times 10^6$  cellule/ml in terreno RPMI 1640 completo, addizionato di 10mM Hepes.

Le cellule sono state seminate in una piastra Petri da 10 cm<sup>2</sup> e incubata a 37°C per 2h. In seguito il surnatante, composto principalmente da linfociti, è stato eliminato o congelato. Dopo aver lavato la piastra con terreno RPMI 1640, i monociti adesi sono stati staccati utilizzando uno scraper. La resa media è di  $5 \times 10^6$  monociti per piastra.



### **3.4 DIFFERENZIAMENTO DEI MONOCITI IN CELLULE DENDRITICHE (DC) o MACROFAGI (MDM).**

Per permettere il differenziamento dei monociti in DC sono state aggiunte al terreno di coltura le seguenti citochine: fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF) (800 U/ml, PeproTech, Londra, UK), ed interleuchina 4 (IL-4) (10 ng/ml, PeproTech, Londra, UK). Le citochine sono state aggiunte nel mezzo di coltura ogni due giorni. Per permettere il differenziamento dei monociti in macrofagi è stato aggiunto al terreno di coltura GM-CSF (800 U/ml, PeproTech, Londra, UK) ogni due giorni. Le cellule sono state coltivate per cinque giorni.

### **3.5 ANALISI IMMUNOFENOTIPICHE.**

Per la caratterizzazione immunofenotipica,  $1 \times 10^5$  cellule sono state risospese in una soluzione di PBS, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1% FBS e incubati per 30 minuti al buio, a 4°, con i seguenti anticorpi monoclonali (mAb) coniugati con iso-tiocianato di fluoresceina (FITC) o ficoeritrina (PE) anti- CD3, -TCR $\alpha\beta$ , -CD14, -HLA-DR, -CD80, -CD86, -CD83 (Becton Dickinson, California, USA).

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lavati con PBS, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1% FBS, centrifugati a 1500 rpm per 5min e risospesi in 1% Paraformaldeide (PFA) e conservati a 4°C. I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

### **3.6 SAGGI FUNZIONALI.**

Al fine di valutare la produzione di TIMP-1,  $2 \times 10^5$  PBMC sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti e mantenuti in terreno di coltura per 48 ore, in presenza o meno di OPN ricombinate 1 $\mu$ g/ml (R&D system, USA). Per indurre l'attivazione dei PBMC le cellule sono state coltivate in presenza o meno di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (clone OKT3) (1 $\mu$ g/mL), precedentemente adeso alla piastra di coltura, incubando 2h a 37°C.

Oppure  $5 \times 10^5$  monociti, o monociti indotti a differenziare a cellule dendritiche o a macrofagi, sono stati seminati in piastre da 48 pozzetti e mantenuti in terreno di coltura RPMI 10% FCS e 10 mM HEPES, con o senza OPN (1 $\mu$ g /mL) (R&D system, USA), per 5 giorni.

I surnatanti delle colture sono stati recuperati ai tempi indicati ed è stata valutata la produzione di TIMP-1 in ELISA.

### **3.7 MACROARRAY a cDNA.**

Due tipi di membrane per macroarray sono state acquistate da Sigma-Genosys (London, UK): Panorama Human Apoptosis Gene Arrays (PRAP0002) e Panorama Human Cytokine Gene Arrays (PRCK0002). Per la preparazione delle due sonde di cDNA, sono stati utilizzati 2µg di RNA totale, estratto da PBMCs tenuti in coltura per 6 giorni e retrotrascritto, secondo le indicazioni fornite dal kit. Le membrane sono state pre-ibridizzate per 2 ore a 65<sup>0</sup>C, denaturate, marcate con <sup>32</sup>P e incubate a 65<sup>0</sup>C per 15 minuti. In seguito le membrane sono state lavate per 2 volte con 0.2X SSC (soluzione di sodio cloruro e sodio citrato)/0.1% SDS (sodio dodecil-solfato) a 65<sup>0</sup>C per 30 minuti e analizzate al phosphoimage scanner (BioRad, Hecules, CA).

### **3.8 SAGGI ELISA.**

I livelli di OPN e TIMP-1, nel siero e nei surnatanti delle colture cellulari, sono stati misurati mediante ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), secondo il protocollo indicato dal fornitore del kit (Assay Design, Stressgen e R&D system, USA). (Sensibilità del kit 0.110 ng/mL). La densità ottica è stata misurata a 450 nm usando un lettore di piastra ottica.

### **3.9 ANALISI STATISTICHE.**

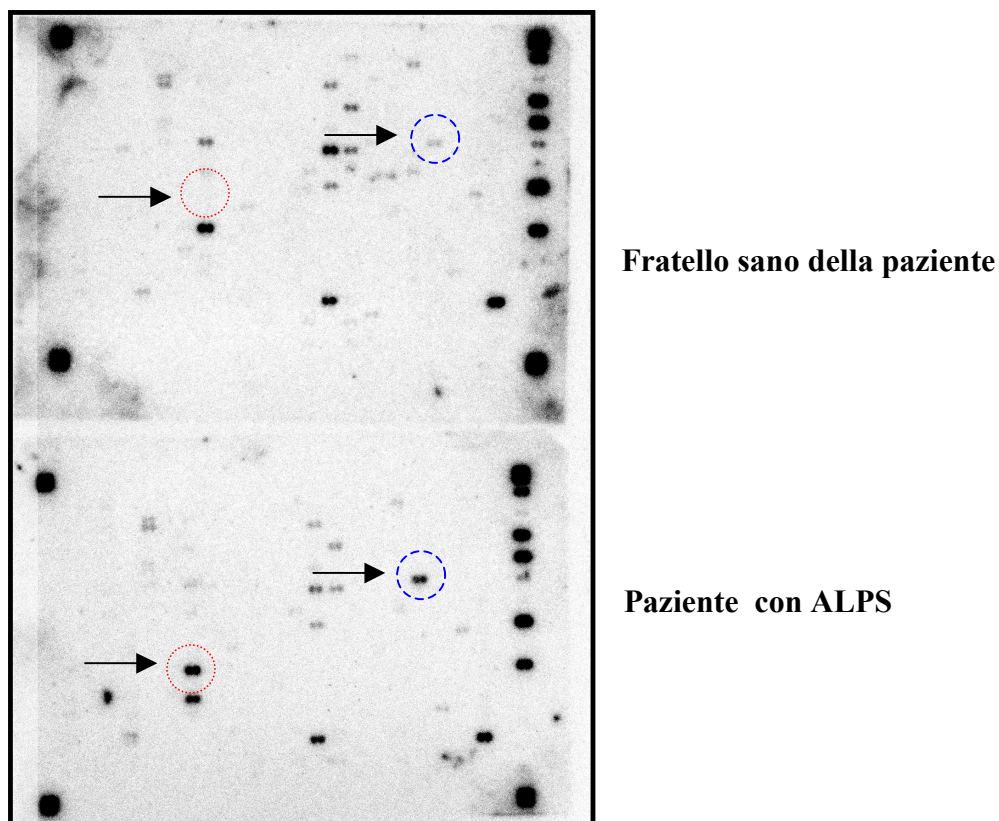
Per quello che riguarda gli ELISA, l'approssimazione ad una distribuzione normale della popolazione è stata testata con la statistica della simmetria. I test impiegati per paragonare gli ELISA sono stati i test non parametrici Mann-Whitney o Wilcoxon. Tutti i valori assunti delle p avevano due code. La regressione lineare di Pearson è stata impiegata per paragonare i livelli di OPN e di TIMP-1.

## 4. RISULTATI.

### 4.1 L'mRNA di TIMP-1 e OPN sono iper-espressione in una paziente con ALPS.

Utilizzando un macroarray a cDNA è stato possibile comparare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi o nell'attivazione cellulare, di una paziente con ALPS e del fratello sano. L'mRNA è stato ottenuto da linfociti T mantenuti in coltura per 6 giorni in presenza di IL-2 e fitoemetoagglutinina (PHA). Il cDNA ottenuto per retro-trascrizione è stato fatto ibridare su di una membrana di nylon che presenta il cDNA di 573 geni. L'espressione di diversi geni era alterata nella paziente, ma in particolare i livelli trascrizionali di TIMP-1 e OPN (**Figura 1**). Inoltre, analisi genetiche condotte sul cDNA di OPN hanno rilevato la presenza di alcuni polimorfismi significativamente associata alla malattia, che formano tre aplotipi (A,B, C). I portatori dell'aplotipo B e/o C hanno un rischio 8 volte maggiore di sviluppare l'ALPS, rispetto agli individui omozigoti AA (dati non mostrati). Quindi gli elevati livelli di OPN nei pazienti con ALPS sono determinati geneticamente.

Questi risultati fanno supporre un possibile ruolo di OPN e TIMP-1 nell'eziopatogenesi dell'ALPS.



**Figura 1:** Autoradiografia della membrana ibridizzata con il cDNA di una paziente con ALPS e del fratello sano. Sono indicati gli spots che corrispondono al cDNA di TIMP-1 (linea tratteggiata) e di OPN (linea a puntini).

#### 4.2 TIMP-1 e OPN sono iper-espressi nel siero dei pazienti con ALPS.

Al fine di generalizzare il dato ottenuto con il macroarray, sono stati valutati i livelli sierici di OPN e TIMP-1 in altri pazienti con ALPS, mediante saggi ELISA.

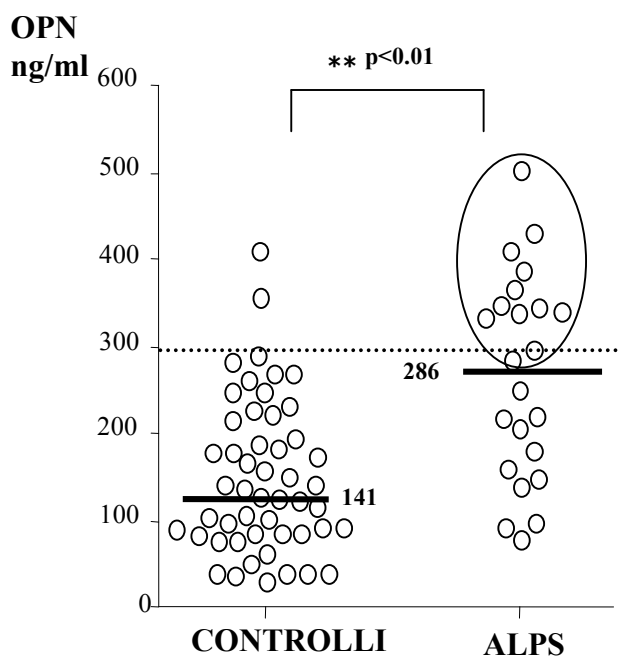
I livelli di OPN sono stati misurati nel siero di 23 pazienti con ALPS e 50 controlli sani. I risultati dimostrano che i pazienti con ALPS mostrano dei livelli di OPN significativamente più elevati [mediana, 286; range 37-512 ng/ml] rispetto ai controlli sani [mediana, 141; range 45-405 ng/ml] ( $p < 0.01$ ) (**Figura 2A**).

Invece i livelli di TIMP-1 sono stati valutati nel siero di 20 pazienti con ALPS [mediana, 132, range 79-294 ng/ml] e 23 controlli sani [mediana 122, range 67-175 ng/ml].

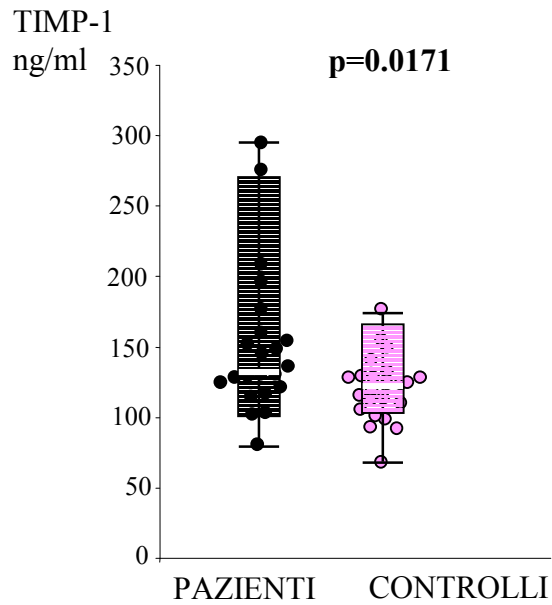
I risultati dimostrano che i pazienti con ALPS presentano dei livelli di TIMP-1 significativamente più elevati rispetto ai controlli ( $p = 0.0171$ ) (**Figura 2B**).

Inoltre, data la concomitante presenza di elevati livelli di OPN e TIMP-1 nel siero dei pazienti con ALPS, è stata ricercata una correlazione tra questi due parametri. È stata identificata una significativa correlazione diretta ( $p = 0.0124$   $r = 0.56$ ), tra i livelli sierici di OPN e TIMP-1, nei pazienti con ALPS (**Figura 2C**).

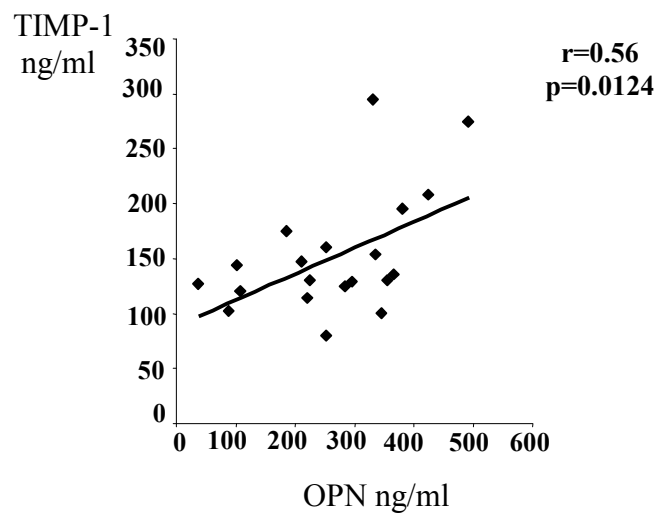
Questi risultati dimostrano una elevata produzione di OPN e TIMP-1 nel siero dei pazienti con ALPS.



**Figura 2A.** Concentrazione sierica di OPN (ng/ml) in 50 controlli sani e 23 pazienti con ALPS. La linea tratteggiata rappresenta il 95° percentile, le linee in grassetto la mediana. Il valore della  $p$  è stato calcolato utilizzando il test statistico Mann-Whitney U. I livelli di OPN sono stati valutati in ELISA.



**Figura 2B:** Concentrazione sierica di TIMP-1 (ng/ml) in 20 pazienti con ALPS e in 23 controlli sani. Le linee in bianco rappresentano la mediana. Il valore della  $p$  è stato calcolato utilizzando il test statistico Mann-Whitney U. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA.



**Figura 2C:** Correlazione tra i livelli sierici di OPN e TIMP-1 nei pazienti con ALPS. La linea rappresenta la miglior retta di regressione. I valori di  $r$  e  $p$  sono stati calcolati con il metodo di Pearson. I livelli di OPN e TIMP-1 sono stati valutati in ELISA.

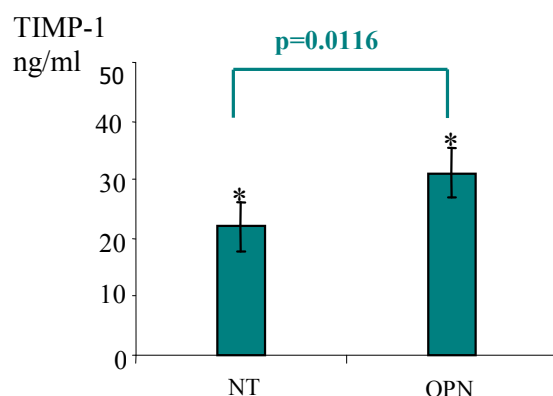
### 4.3 OPN ricombinante induce la produzione di TIMP-1 *in vitro*.

Dal momento che non esistono polimorfismi significativi nel gene di TIMP-1 associati all'ALPS, abbiamo verificato se OPN ricombinante induca la produzione di TIMP-1 nei PBMC *in vitro*, al fine di spiegare gli elevati livelli sierici della proteina riscontrati nei pazienti.

Esperimenti preliminari sono stati condotti su PBMC di donatori sani, ottenuti per separazione su gradiente, al fine di mettere a punto i tempi e la dose di rOPN da utilizzare per i nostri esperimenti (dati non mostrati).

In base ai dati ottenuti è stato scelto di stimolare i PBMC per 48 ore con 1µg/ml di rOPN. Dopo il tempo indicato, i surnatanti delle colture cellulari sono stati raccolti ed è stata valutata la produzione di TIMP-1, mediante saggio ELISA. I risultati mostrano che il trattamento con rOPN induce la produzione di TIMP-1 nei PBMC (**Figura 3**).

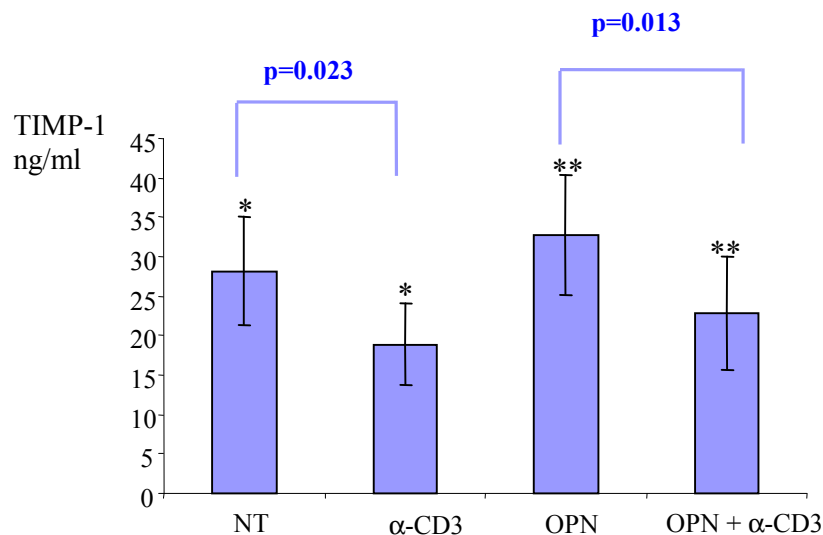
I risultati mostrano che rOPN induce la produzione di TIMP-1 *in vitro*.



**Figura 3:** Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con rOPN 1µg/ml. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 48 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon.

### 4.4 L'attivazione con anti-CD3 influenza la produzione di TIMP-1 nei PBMC.

In seguito, abbiamo valutato se l'attivazione dei linfociti T, tramite stimolazione del TCR, potesse influenzare la produzione di TIMP-1. I PBMC sono stati attivati o meno con 1µg/ml di anticorpo anti-CD3 (clone OKT-3), in presenza o in assenza di 1µg/ml di rOPN per 48 ore, ed è stata quindi valutata la produzione di TIMP-1 mediante saggio ELISA. I risultati mostrano che l'attivazione con l'anticorpo anti-CD3 riduce la produzione di TIMP-1, sia in assenza che in presenza di rOPN (**Figura 4**).



**Figura 4:** Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con rOPN 1µg/ml in presenza o meno dell'anticorpo anti-CD3, precedentemente fatto aderire alla piastra di coltura per 2h a 37°C. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 48 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon.

#### 4.5 rOPN influenza la produzione di TIMP-1 nei monociti , nelle cellule dendritiche e nei macrofagi.

Al fine di comprendere quale tipo cellulare sia responsabile della produzione di TIMP-1, è stato testato l'effetto di rOPN su monociti, cellule dendritiche e macrofagi, ottenuti per differenziamento dai PBMC.

I monociti sono stati trattati o meno con 1µg/ml di OPN per 5 giorni. Al tempo indicato i surnatanti delle colture sono stati raccolti ed è stata valutata la produzione di TIMP-1 mediante ELISA. I risultati dimostrano che rOPN induce la produzione di TIMP-1 nei monociti (**Figura 5A**).

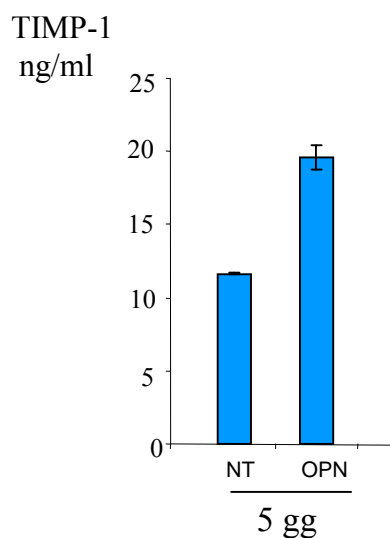
In seguito è stato valutato l'effetto di OPNr su cellule dendritiche, ottenute per differenziamento dai monociti, in presenza di GM-CSF (800U/ml) e IL-4 (10ng/ml), le quali sono state trattate o meno con 1µg/ml di OPNr per 5 giorni. Quindi sono stati valutati i livelli di TIMP-1 mediante ELISA e i risultati dimostrano che rOPN diminuisce la produzione di TIMP-1 nelle cellule dendritiche (**Figura 5B**).

Infine è stato testato l'effetto di OPNr su macrofagi, ottenuti per differenziamento dai monociti in presenza di GM-CSF (800 U/ml), i quali sono stati trattati o meno con 1µg/ml di rOPN per 5 giorni.

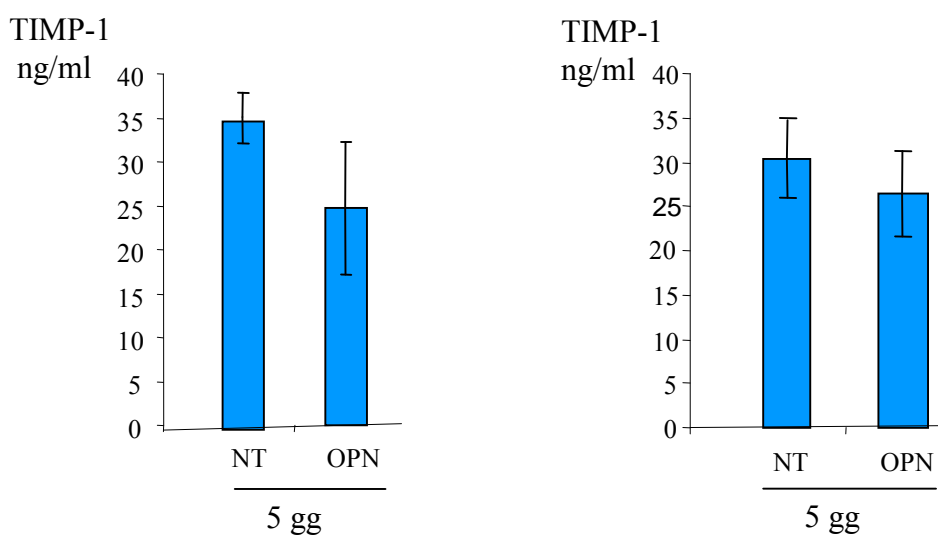
Dopo 5 giorni di coltura i surnatanti delle colture sono stati raccolti ed è stata valutata la produzione di TIMP-1 mediante ELISA. I risultati ottenuti dimostrano che anche in questa

popolazione cellulare il trattamento con rOPN diminuisce la produzione di TIMP-1 (**Figura 5B**).

I risultati ottenuti dimostrano che, nelle nostre condizioni sperimentali, rOPN induce la produzione di TIMP-1 nei monociti mentre è inibita in cellule dendritiche e nei macrofagi.



**Figura 5A:** Produzione di TIMP-1 da monociti dopo stimolazione con rOPN 1  $\mu\text{g/ml}$ . I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 5 giorni di coltura.



**Figura 5B:** Produzione di TIMP-1 da cellule dendritiche e macrofagi dopo stimolazione con rOPN 1  $\mu\text{g/ml}$ . I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 5 giorni di coltura.



## 5.DISCUSSIONE

I pazienti affetti da ALPS sviluppano un quadro autoimmune caratterizzato da disordini dell'omeostasi dei linfociti, con accumulo di linfociti nella milza e nei linfonodi e da espansione clonale di linfociti T doppi negativi (DN) CD4/CD8, TCR  $\alpha\beta$  positivi e da difetti funzionali del sistema Fas/Fas ligando. Il nostro laboratorio ha individuato una variante dell'ALPS, definita DALD (*Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease*) che, pur manifestando un quadro clinico di tipo ALPS, non presenta espansione periferica di linfociti T DN.

Ad oggi sono state identificate quattro varianti genetiche della malattia, che hanno permesso di individuare i sottotipi ALPS-Ia (mutazione di Fas), ALPS-Ib (mutazione di FasL), ALPS-II (mutazione di caspasi 10), ALPS-IV (mutazione di n-Ras). Esiste comunque un ampio numero di pazienti, identificati come ALPSIII, in cui non è noto il difetto genetico associato alla malattia. Inoltre la penetranza di queste mutazioni è incompleta e questo suggerisce che altri fattori complementari siano probabilmente coinvolti nello sviluppo della malattia.

In particolare abbiamo posto la nostra attenzione su OPN e TIMP-1 poiché, mediante macroarray a cDNA, è stata identificata una paziente con ALPS, in cui i livelli trascrizionali di OPN e TIMP-1 sono elevati, rispetto al fratello sano.

Al fine di valutare la generalità di tale dato, abbiamo esteso l'analisi dei livelli sierici di OPN e TIMP-1 in altri 19 pazienti con ALPS e in 23 controlli. I dati ottenuti dimostrano che i pazienti con ALPS presentano livelli sierici di TIMP-1 e OPN significativamente più elevati rispetto ai controlli sani. Quindi questi dati suggeriscono un possibile coinvolgimento di queste proteine nella patogenesi dell'ALPS.

Gli elevati livelli sierici di OPN sembrano essere determinati geneticamente. Infatti, analisi genetiche del gene di OPN hanno identificato tre aplotipi (A, B e C), con frequenze significativamente diverse nei pazienti e nei controlli. L'aplotipo A è più frequente nei controlli e gli aplotipi B e C, sono invece più frequenti nei pazienti. Gli individui portatori di almeno un aplotipo B o C corrono il rischio di sviluppare la malattia con una frequenza 8 volte maggiore, rispetto agli individui omozigoti AA. Vari dati sperimentali hanno dimostrato che gli aplotipi B e C sono responsabili della produzione di elevati livelli sierici di OPN, i quali a loro volta potrebbero contribuire allo sviluppo dell'ALPS (Chiocchetti A. et. al., 2004).

La concomitante presenza di elevati livelli di OPN e TIMP-1 nei pazienti ci ha indotto ad indagare se fosse presente una correlazione tra questi due parametri. Abbiamo così identificato una diretta correlazione significativa tra i livelli sierici di OPN e TIMP-1 nei

pazienti con ALPS. Tale dato può essere spiegato con la presenza di variazioni nel gene di TIMP-1, che ne possano determinare gli elevati livelli sierici nei pazienti o da una relazione funzionale tra la produzione di OPN e TIMP-1.

In relazione alla prima ipotesi, analisi genetiche del gene di TIMP-1, precedentemente effettuate, non hanno riscontrato polimorfismi associati all'ALPS. Quindi abbiamo valutato se la produzione di TIMP-1 fosse indotta da rOPN *in vitro*.

Risultati ottenuti su PBMC di donatori sani, trattati con 1µg/ml di rOPN per 48 ore, hanno dimostrato un'induzione della produzione di TIMP-1.

In seguito abbiamo valutato se l'attivazione dei PBMC, in presenza di un anticorpo anti-CD3, interferisca con la produzione di TIMP-1, indotta da rOPN. I dati dimostrano che i pazienti con ALPS quando attivano il sistema immunitario, diminuiscono la produzione di TIMP-1, rispetto ai soggetti normali, e questo potrebbe essere dovuto al fatto che presentano livelli di OPN più elevati, oppure che venga indotta la produzione di citochine che contrastano la produzione di TIMP-1. Tuttavia sono necessarie ulteriori indagini per spiegare meglio il meccanismo.

Abbiamo poi valutato quale popolazione cellulare fosse responsabile della produzione di TIMP-1. A proposito, monociti, cellule dendritiche e macrofagi sono stati stimolati con rOPN. I risultati ottenuti ci permettono di concludere che, nelle nostre condizioni sperimentali, rOPN induce la produzione di TIMP-1 nei monociti, mentre negli altri tipi cellulari esaminati, rOPN regola negativamente i livelli di questa proteina.

I dati ottenuti ci permettono di formulare alcune ipotesi al fine di spiegare il ruolo di TIMP-1 nello sviluppo dell'ALPS.

Per quanto riguarda le cellule dendritiche e i macrofagi, è possibile supporre che in seguito alla diminuzione di TIMP-1, segua un aumento dell'attività delle MMPs e quindi un'eccessiva migrazione cellulare, con una favorita presentazione di autoantigeni, contribuendo così allo sviluppo del quadro autoimmune. Inoltre il rilascio di MMPs da parte dei linfociti, favorisce la produzione di epitopi immunodominanti (Descamps FJ., et al., 2003).

Inoltre, nel nostro laboratorio è stato dimostrato che gli alti livelli di OPN e il difetto del sistema Fas/FasL sono due fattori tra loro indipendenti. Infatti rOPN non influenza la morte cellulare indotta da Fas *in vitro*. Quindi si può supporre che la produzione di TIMP-1 da parte dei monociti, contribuisca al difetto apoptotico tipico dell'ALPS. Questa ipotesi è supportata

dal fatto che, è noto in letteratura che TIMP-1 inibisce la morte cellulare programmata, Fas dipendente (Guedez L., et. al., 1998).

## 6. PROSPETTIVE FUTURE

Gli studi futuri saranno volti a comprendere il ruolo dell'attivazione, tramite stimolazione del TCR, ai fini della produzione di TIMP-1 e a testare l'effetto di un anticorpo neutralizzante anti-OPN, per confermare la produzione di TIMP-1 nelle nostre condizioni sperimentali. In seguito verranno svolti degli esperimenti in presenza di TIMP-1 ricombinante per valutare la produzione di OPN e di altre citochine coinvolte nello sviluppo dell'autoimmunità. Infine indagheremo l'azione anti-apoptotica di TIMP-1 MMP indipendente, descritta in letteratura, dato che nell'ALPS è riscontrato il difetto apoptotico dei linfociti T.

## BIBLIOGRAFIA

Nat R., E. Radu, T. Regalia and L. M. Popescu Apoptosis in the immune system: Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002; 6:223-234.

Peng Y., Martin D., Kenkel J., Zhang K., Ogden C., and Elkon K. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells, *J Autoimm.*, 2007; in press.

Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998;281:1305-1308.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000;288:2354-2357.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997;88:355-36.

Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology*, 2001 22:

Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 1995; 9:277-1287.

Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.

Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.

Rieux-Lauca F., F. Le Deist and A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation (Nature)* 2003; 10:124-133.

Kuijf ML., Godschalk PC., Gilbert M., Endtz HP., Tio-Gillen AP., Ang CW., van Doorn PA. And Jacobs BC Origin of ganglioside complex antibodies in Guillan-Barrè syndrome. *J. Neuroimmunol.* 2007;2:69-73.

Tsonis IA, Avrameas S, Moutsopoulos HM. Autoimmunity and pathophysiology. *J. Autoimmun.* 2007 [Epub ahead of print]

Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967;70:891-899.

Straus S. E., M. Sneller, M. J. Lenardo, J. m. Puck and W. Strober An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:591-601.

Bleesing J. J. H., M. R. Brown, S. E. Straus, J.K Dale, R. M. Siegel, M. Jonhson, M.J. Lenardo, J.M. Puck and T. A. Fleisher, Immunophenotypic profiles in family with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001,98:2466-2473.

Lopatin U., R. K. Williams, J. J. H. Bleesing, J. K. Dale, D. Wong, J. T. Feldstein, S, Fritz, M. R: Morrow, I. Fuss, M. C. Sneller, M. Raffeld T. A. Fleisher, J. M. Puck W. Strober, E. S. Jaffe and S. S. E. Straus Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with diseases expression. *Blood*, 2001,97:3161-3170.

Campagnoli M.F., L. Garbarini, P.Quarello, E. Garelli, A. Carando, V. Baravalle, A, Doria, A, Biava, A. Chiocchetti, A. Rosolen, C. Dufur, U. Dianzani and U. Ramenghi The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 2006;91:538-541.

Martin D.A., L. Zheng, R. M. Siegel, B. Huang, G.H. Fisher, J. Wang, C.E: Jackson, J.M. Puck, J. Dale, S. E. Straus, M. E. Peter, P. H. Krammer, S. Fesik and M.J, Lenardo Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia *PNAS*; 1999,96: 4552-4557.

A. van den Berg, E. Maggio, A. Diepstra, D. de Jong, J. van Krieken and S. Poppema Germline Fas gene mutation in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2002;99:1492-1494.

Oliveira JB, N. Bidere, JE. Niemela, L. Zheng, K. Sakai, CP. Nix, RL. Danner, J. Barb, PJ. Munson, JM. Puck, J. Dale, SE. Straus, TA. Fleisher and MJ. Lenardo NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative sindrome *PNAS*, 2007; 21:8953-8958.

Benihoud K, Bonardelle D, Bobe P, Kiger N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol.*, 1997; 27:415-420.

Jackson C. E., R. E. Fischer, A.P Hsu, S. M. Anderson, Y. Choi, J. Wang, J.K Dale, T. A. Fleisher, L.A. Middleton, M. C. Sneller, M.J. Lenardo, S. E. Straus and J.M. Puck Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance *Am. J. Hum. Gen.* 1999,64:1002-1014.

Ramenghi U., S. Bonissoni, g. Migliaretti, S. DeFranco, F. Bottarel, C. Gambaruto, D. DiFranco, R. Priori, F. Conti, I. Dianzani, G. Valesini, F. Merletti and U. Dianzani Deficient

of apoptosis pathway without fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000;95:3176-13182.

Denhardt D. T., M. Noda, A. W., O'Regan, D. Pavlin and J. S. Berman Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling and cell survival. *The Journal of Clinical Investig.* 2001; 9:1055-1061.

Ellen M. Gravallesse Osteopontine: a bridge between bone and the immune system. *The Jour. Of Clin. Investig.*, 2003;112:147-149.

Mazzali M., T. Kipari, V. Ophascharoensuk, J.A. Wesson, R. Johnson And j. Hughes Osteopontin: a molecule for all seasons. *Q. J. Med.*, 2002;95:3-13.

Naldini A, D.Leali, A. Pucci, E. Morena, F. Carraro, B. Nico, D. Ribatti and M. Presta Cutting edge: IL1 $\beta$  mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *The Journal of Immunology* 2006:177,4267-4270.

Prince CW. et. al., Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein fom rat bone *J. Biol. Chem.*, 1987;272:2900-2907.

Senger D. R. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelia growth factor through cooperative mechanism involving the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.* 149:293-305, 1996.

Mitsiades N., Wei-hsuan Yu, V. Poulaki, M. Tsokos and I. Stamenkovic Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drugs cytotoxicity. *Cancer Reserch*, 2001;61:577-581.

Ashkar, S.; Weber, G. F.; Panoutsakopoulou, V.; Sanchirico, M. E.; Jansson, M.; Zawaideh, S.; Rittling, S. R.; Denhardt, D. T.; Glimcher, M. J.; Cantor, H. : Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*,2000; 287: 860-864.

Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL. Et. Al., Osteopontin, a novel substrate for trasglutminase and factor VIII activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1991;177:1205-1210.

O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol.* 2000;81:373-390.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061.

Lin YH. and H. F. Yang-Yen The osteopontin-CD44 survival involves activation of the phosphatidyinositol 3-Kinase/Akt signalling pathway. *The Journ. of Biological Chem.*, 2001;276:46024-46030.

Young MF., Kerr JM., Termine JD., Wewer UM:, Wang MG., McBride OW. And Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*; 1990, 4:491-502.

- Giacopelli F, R. Marciano, A. Pistorio, P. Catarsi, S. Caninoi, G. Karsenty and R. Ravazzolo Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol. Genomics*, 2004;20: 87-96.
- Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol.* 2004;26:179-84.
- Denhardt DT., Giachelli CM. and Rittling SR Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001;41:723-749.
- O' Regan A. and Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation *Int J Exp Pathol.* 2000; 81:373-390.
- O'Regan AW., Chupp GL., Lowry JA., Goetschkes M., Mulligan N. and Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J. Immunology*, 1999;162:1024-1031.
- O'Regan A.W., J.M. Hayden and J. S. Berman Osteopontin augments CD3-mediated interferon- $\gamma$  and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *Journ. of Leukocyte Biology*, 2000; 68:495-502.
- Hashimoto M., D. Sun, S. R. Rittling, D. T. Denhardt and W. Young Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *The Journal of Neuroscience*, 2007;27:3603-3611.
- Rollo EE. and Denhardt DT. Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice. *Immunology*, 1996; 4:642-647.
- Guo, H.C. Q, Cai, R. a. Schroder and P. C. Kuo Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages *The Journal of Immunology*; 2001;166:1079-1086.
- Takahashi F., Takahashi K., Maeda K., Tominaga S. and Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. *IUBMB Life*, 2001;49:100-103.
- Xanthou G, T. Alissafi, M. Semitekolou, D. C. M. Simoes, E. Economidou, M. Gaga, B. N. Lambrecht, C. M. Llyod and V. Panoutsakopoulou Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subset. *Nature Medicine*, 2007.
- Rangaswami H., A. Bulbule and GC. Kundu Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression *TRENDS in Cell Biology*, 2006 16:79-87.
- Rittling SR. and Chambers AF Role of osteopontin in tumor progression *Br. J. Cancer*, 2004; 90:1877-1881.
- Wai PY. Et. Al., Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murin colon adenocarcinoma metastasis *Carcinogenesis*, 2004;26:741-751.
- O'Regan AW ., Nau GJ., Chupp GL. And Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol. Today*, 2000;10:475-478.

Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K et al. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2097-2106.

Agnholt, J. Kelsen, L. Shack, C. L. Hvas, J. F. Dahlerup and E. S. Sorensen Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scandin. Journal of Immunology*, 2007; 65:453-460.

Zohar R, B. Zhu, P. Liu, J. Sodek and C. A. McCulloch Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, 2004;287:1730-1739.

Blom, T.; Franzen, A.; Heinegard, D.; Holmdahl, R. : Comment on 'The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.' *Science*; 2003, 299: 1845.

E. M. Hur, S. Youssef, M. E. Haws, S. Y. Zhang, R. A. Sobel and L. Steinman Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology*, 2007;8:74-83.

Stromnes I. M. and J. M. Goverman Osteopontin-induced survival of T cells. *Nature Immunology*, 2007, 8:19-20.

Mishima R, Takeshima F, Sawai T, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Omagari K, Mizuta Y, Ozono Y, Kohno S. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.*, 2007;41:167-172.

Chiocchetti A., M. Indelicato, T. Bensi, R. Mesturini, M. Giordano, S. Sametti, L. Castelli, F. Bottarel, M.C. Mazzarino, L. Garbarini, F. Giacomelli, G. Valesini, C. Santoro, I. Dianzani, U. Ramenghi and U. Dianzani High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/ lymphoproliferation. *Blood*, 2004;103-1376-1382.

Chiocchetti A., C. Comi, M. Indelicato, L. Castelli, R. Mesturini, T. Bensi, M.C. Mazzarino, M. Giordano, P. Somigliano-Richiardi, M. Liguori, M. Zorzon, A. Amoroso, M. Trojano, F. Monaco, M. Leone, C. Magnani and U. Dianzani Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *The Jour. of Neuroimmunology*. 2005, 163:172-178.

D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacomelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Somigliano-Richiardi P. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2005;5:539-47.

Renkl A. C, J. Wussler, T. Ahrens, K. Thoma, S. Kon, T. Uede, S. F. Martin, J. C. Simon and J. M. Weiss Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th-1 polarizing phenotype. *Blood*, 2005; 106:946-955.

Bird L. Osteopontin: role in MS relapse. *Nature Immunology*, 2007, 7:7.

- Visse R.; H. Nagase Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (structure, functions and biochemistry). *Circulation Research* 2003;92:827-839.
- Baratelli FE., Heuzè-Vourc'h N., Krysan K., Dohadwala M., Riedl K., Sharma S. and Dubinett SM. Prostaglandin E2-Dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cells migration through extracellular matrix *J. Immunol.*, 2004;173:5458-5466.
- Avalos BR., Kaufman SE., Tomonaga M., Williams RE., Golde DW., Gasson JC. K562 produce cells and responde to human erythroid-potentiating activity *Blood*, 1988;80:733-743.
- Goetzl EJ., Banda MJ. Leppert D. Matrix metalloproteinases and immunity *J. Immunol.*, 1996;87:5578-5582.
- Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P, Hornebeck W, Haye B, Petitfrere E. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J.* 2003;372:767-774.
- Baker A. H D. R. Edwards and G. Murphy Metalloproteinases inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science.* 2002, 115:3719-3727.
- Carmichael, D. F.; Sommer, A.; Thompson, R. C.; Anderson, D. C.; Smith, C. G.; Welgus, H. G.; Stricklin, G. P. : Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1986; 83: 2407-2411.
- Lacraz S., Nicod LP., Chicheportiche R., Welgus HG. And Dayer JM IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes *J. Clin. Invest*, 1995; 96:2304-2310.
- Chirco R, X.W. Liu, K, Jung and H. R. Choi-Kim Novel functions of TIMPs in cell signalling. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006; 25:99-113.
- Jung KK, XW. Liu, R. Chirci, R. Fridman, and HR. Choi Kim Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein *The EMBO journal*, 2006;25:3934-3942.
- Pfistershammer K., Majdic O., Stockl J., Zlabinger G., Kirchberg S., Steinberger P., Knapp W. Cd63 as an activation-linked T cell costimulatory element *J. Immunol.*, 2004;173:6000-6008.
- Ogier C., R, Creidy, J. Boucraut, P.D: Soloway, M. Kherestchatisky and S. Rivera Astrocyte reactivity to Fas activation is attenuated in TIMP-1 deficient mice, an in vivo study. *BMC Neuroscience*, 2005; 6:68-80.
- Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moundjian R, Del Maestro R, Beliveau R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17:555-66.
- Chromek M., K. Tullus, J. Lundhal and A. Brauner Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation. *Infection and Immunity*, 2004;72:82-88.



Crocker S. J., J. K. Whitmire, R. F. Frausto, P. Chertboonmuang, P. D. Soloway, J. L. Whitton and I. L. Campbell Persistent macrophage/microglial activation and myelin disruption after experimental autoimmune encephalomyelitis in Tissue inhibitors of metalloproteinase 1-deficient mice. *The American journal of Pathology*, 2006;169:2104-2116.

Jourquin J, Tremblay E, Bernard A, Charton G, Chaillan FA, Marchetti E, Roman FS, Soloway PD, Dive V, Yiotakis A, Khrestchatsky M, Rivera S. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulates neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory. *Eur J Neurosci*. 2005;22:2569-78.

Guedez L., A. Martinez, S. Zhao, A. Viveto, S. Pittalunga, M. S. Stevenson, M. Raffeld and W. G. S. Stevenson Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implication in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood*, 2005;105:166-1668.

Guedez L., W. G. Stetler-Stevenson, L. Wolff, J. Wang, P. Fukushima, A. Mansoor and M. Stetler-Stevenson In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitors of metalloproteinase 1. *The Journal of Clinical Investig.*, 1998, 102;2002-2010.

Liu X.W., M.E Taube, K.K Jung, Z. Dong, Y. J. Le, S. Roshy, B. F. Sloane, R. Fridman and H-R Choi Kim Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of Tissue inhibitors of metalloproteinase 1. *Cancer Res*. 2005; 65:989-906.

Taube ME., Liu XW, Fridman R. and Kim HRC. TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27<sup>Kip1</sup> protein *Oncogene*, 2006; 25:3041-3048.

Okuyama S., A. Komatsuda, H. Wakui, N. Aiba, N. Fujishima, K. Iwamoto, H. Ohtani and K-I. Sawada Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2005;20:539-544.

Li GR., Fridman and H-R Choi Kim Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 inhibits apoptosis in human breast epithelial cell. *Cancer Res*. 1999; 59,6267-6275.

Oelmann E., H. Herbst, M. Zuhlsdorf, O. Albrecht, A. Nolte, C. Schmitmann, O. Manzke, V. Dieh, H. Stein and W. E. Berdel Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 2002;99:258-267.

Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest*. 1998;102:2002-10.

Gaudin P., Trocme C., Berthier S., Kieffer S., Boutonnat J., Lamy C., Surla A., Garin J and F. Morel TIMP-1/MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000; 1499:19-33.

Ritter LM., Garfield SH., Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cell *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 257:494-499.

Jiang H, Zhu H, Chen X, Peng Y, Wang J, Liu F, Shi S, Fu B, Lu Y, Hong Q, Feng Z, Hou K, Sun X, Cai G, Zhang X, Xie Y. TIMP-1 transgenic mice recover from diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin. *Diabetes*. 2007;5:49-56.

Matache C., M. Stefanescu, C. Dragomir, S. Tanaseanu, A. Onu, A. Ofiteru and G. Szegli Matrix metalloproteinase-9 and its natural inhibitor TIMP-1 expressed or secreted by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 2003; 20:323-331.

Ozenci V., Rinaldi L., Teleshova N., Matusevicius D., Kivisakk P., Kouwenhoven M Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis *J. Autoimm.*, 1999;12:297-303.

Seitz M. and J. M. Dayer Enhanced production of Tissue inhibitors of metalloproteinases by peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients responding to methotrexate treatment. *Rheumatology*, 2000; 39:637-645.

Bokarewa m., Dahlberg L. and Tarkowski A Expression and functional properties of antibodies to tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in rheumatoid arthritis *Arthritis Res. & Therapy*, 2005,7:1014-1022.

Descamps FJ, Van den Steen PE, Nelissen I, Van Damme J, Opdenakker G. Remnant epitopes generate autoimmunity: from rheumatoid arthritis and multiple sclerosis to diabetes. *Adv Exp Med Biol.*, 2003;535:69-77.

## **ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA**

Corso di statistica tenuto dal Prof. C. Magnani  
Corso di inglese tenuto dal Prof. I. Bell

## **SEMINARI interni al dipartimento di Scienze Mediche**

GENE SILENCING BY RNA INTERFERENCE (RNAI)  
10 GENNAIO 2007  
Prof.ssa P. DeFilippi

AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC SCLEROSIS: FROM CLINICAL SUBSET TO  
PATHOGENETIC  
12 GENNAIO 2007:  
Prof. Chizzolini

DETECTION OF miRNA TARGET GENES THROUGH STATISTICAL  
ANALYSIS OF DNA MOTIFS IN HUMAN-MOUSE 3'-UTR REGIONS  
17 GENNAIO 2007  
Prof. M. Caselle

PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1: stiamo vincendo o stiamo perdendo?  
18 GENAIO 2007  
Prof. GF Bottazzo

GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA

1 FEBBRAIO 2007

Prof. B. Thöny

VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA

9 FEBBRAIO 2007

Prof. M Tripodi

THE LONG HAND OF THE SMALL RNAs REACHES INTO SEVERAL LEVELS OF  
GENE REGULATION

15 FEBBRAIO 2007

Prof. Carlo Cogoni

HUMAN CYTOMAGALOVIRUS (HCMV) FROM CLINIC TO THE BENCH AND  
RETURN

19 FEBBRAIO 2007

Prof. Thomas Mertens

FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE  
DYSMORPHOGENESIS

22 FEBBRAIO 2007

Prof. C. Bagni,

LA VALUTAZIONE DEL CONTROLLO NERVOSO DELLA CIRCOLAZIONE IN  
CLINICA DALLA TEORIA ALLE APPLICAZIONI PRATICHE

22 FEBBRAIO 2007

PROF. M. Pagani

PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED  
SENSITIVITY

14 MARZO 2007

Dr. M. Cretich

COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI

15 MARZO 2007

Prof. M. Podda

MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI  
BIOMARCATORI TUMORALI

16 MARZO 2007

Dott.ssa M. Capra

DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER

16 MARZO 2007

Dott. Bohmann

MARCATORI FARMACOGENETICI NEL CARCINOMA COLORETTALE: QUALI  
PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA?

29 MARZO 2007

Prof. E. Mini

RELAZIONE TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE  
ANALISI DEL PREOTEIN DATA BASE  
12 APRILE 2007  
Prof. Milanesio

PATHOGENIC VIRUSES: SMART MANIPULATORS OF THE INTERFERON SYSTEM  
19 APRILE 2007  
Prof. Otto Haller

DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR  
16 MAGGIO 2007  
Prof. Ferrari

THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING  
25 MAGGIO 2007  
Dott. Karlsson

TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR  
SHWACHMANN DIAMOND SYNDROME  
28 MAGGIO 2007  
Dott. Ellis

SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE  
4 GIUGNO 2007  
Prof. A Martini

LA GENESI DEI GLIOMI E I SUOI RISVOLTI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI  
14 GIUGNO 2007:  
Prof. Schiffer

BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRs AND FOR THE  
PRODUCTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE  
21 GIUGNO 2007  
Prof. E Mignone

**PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:**

<sup>th</sup>

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

6-9 giugno 2007, Trieste

**COMUNICAZIONI A CONGRESSI:**

<sup>th</sup>

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY 6-9 giugno 2007, Trieste

Poster: M. Indelicato, E. Boggio, S. Nicola, U. Dianzani, C. Mazzarino and A. Chiocchetti; *Osteopontin and TIMP-1 are involved in the development of autoimmunity-lymphoproliferation.*