

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



*Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare*

Ciclo XXII

RELAZIONE 3° ANNO

***TIMP-1 nello SVILUPPO della SINDROME
AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA***

Candidato:
Elena Boggio

Responsabile scientifico:
Prof. Umberto Dianzani

1. INTRODUZIONE

1.1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI.

L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale sia nello sviluppo delle cellule degli organi linfoidei 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).

1.1.2 L'APOPTOSI E L'OMEOSTASI DEI LINFOCITI T.

I progenitori dei linfociti T nascono nel midollo osseo e migrano nel timo per sottoporsi ad un processo di maturazione attraverso il quale acquisiscono un TCR antigene specifico. Questo processo coinvolge un riarrangiamento dei geni che codificano per le subunità α e β

del TCR, generando un numero infinito di TCRs con differente specificità. I linfociti in cui questo riarrangiamento non produce un TCR funzionale, che quindi presenta elevata affinità per antigeni *self*, muore per apoptosi. Al contrario i linfociti con un TCR funzionale migrano dal timo come linfociti T naïve, e si attivano nel momento in cui incontrano un antigene riconosciuto dal proprio TCR. Rapidamente questi linfociti proliferano e si differenziano in linfociti effettori i quali partecipano all'eliminazione della sorgente dell'antigene. I linfociti T maturi possono essere citotossici, i quali per esempio uccidono le cellule infettate da virus; *helper*, i quali svolgono funzioni *help* per i linfociti B nel produrre anticorpi; regolatori, i quali controllano e *down-regolano* la risposta immunitaria (Bouillet et al., 2009). Una forma di apoptosi attraverso la quale i linfociti T attivati vanno incontro a morte è l'AICD (*Activation Induced Cell Death*).

1.1.3 L'AICD (Activation Induced Cell Death).

Con il termine AICD si intende un processo attraverso il quale i linfociti T attivati per mezzo del TCR e ristimolati, vanno incontro ad un processo di morte cellulare che coinvolge i recettori, come CD95 e il TNFR (*Tumor-necrosis factor receptor*) (Krammer P. et al.,2007). Per alcuni ricercatori l'AICD è una forma di apoptosi che si in seguito al legame del TCR da parte di un antigene o di un mitogeno, durante lo sviluppo dei linfociti T nel timo (tolleranza centrale, selezione negativa) o quando un linfocita T maturo incontra un antigene in periferia, (tolleranza periferica). Per altri l'AICD è la morte dei linfociti T attivati sottoposti a ristimolazione e quindi con spegnimento della risposta immunitaria.

L'AICD è coinvolta nella tolleranza periferica in quanto controlla l'espansione dei linfociti T stimolati attraverso la via apoptotica dipendente da Fas. La fase di espansione è seguita da una fase in cui il numero di linfociti T diminuisce e ritorna a livelli normali. Questo processo è altamente regolato e richiede uno *switch* tra la vita e la morte dei linfociti T attivati. 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. L'AICD oltre a coinvolgere la via estrinseca dell'apoptosi, coinvolge anche la via intrinseca, in particolare il mitocondrio e i membri della famiglia di Bcl₂. Recentemente anche NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) è stato identificato come un fattore in grado di regolare l'AICD attraverso HPK1 (*Hematopoietic Progenitor Kinase1*) (Brenner D. et al.,2007; Brenner D. et al.,2005). Dopo l'attivazione e l'espansione dei linfociti T, il taglio proteolitico di HPK1 operato da caspasi 3, genera un residuo C-terminale (HPK1-C) in grado di inibire NF-κB, attraverso la fosforilazione di

IKK β . A questi eventi seguono l'espressione di differenti geni anti-apoptotici e l'innescamento dell'AICD. L'AICD mediata da HPK1C è indipendente da Fas, ma coinvolge le caspasi.

L'AICD mediata da Fas gioca un ruolo fondamentale nella remissione spontanea dell'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelites*), suggerendo l'importanza di questo meccanismo nella risposta autoimmune. Un difetto di AICD è stato riscontrato in un modello murino di artrite reumatoide, associato ad un'iperespressione di c-FLIP (*FLICE-inhibitory protein*), principale inibitore del *pathway* di Fas, con conseguente iper-proliferazione dei linfociti CD4 autoreattivi (Zhang J. et al,2004).

1.1.4 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, 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 linfofosfina, quello per l'NGF (*nerve growth factor*), 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), il quale 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 effettiva innescano 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 è 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 procaspasi 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). La 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. FLIP inibisce l'apoptosi indotta da Fas e da altri recettori di morte modulando l'attività del DISC e inibendo l'attività di caspasi 8.

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

1.1.5 IL RUOLO DI CD95 NELL'ELIMINAZIONE DEI LINFOCITI T.

La mancanza di CD95 o CD95L nel topo porta ad un accumulo di linfociti T e B, in particolare il sottotipo di linfociti T $TCR\alpha\beta^+CD3^+CD4^-CD8^-$ doppi negativi, favorendo un quadro di autoimmunità. La presenza di questi linfociti T è stata osservata anche in soggetti affetti da ALPS (Rieux-Laucat F. et al., 1995). Questi linfociti T doppi negativi si pensa che possano originare da linfociti T attivati i quali non vanno incontro a morte cellulare programmata, in seguito alla riattivazione da parte del loro TCR. Questo tipo di morte è stato dimostrato coinvolgere il legame CD95-CD95L. Il concetto che l'AICD dipenda dall'attivazione del segnale dipendente da CD95-95L è ben noto. Per molti ricercatori l'AICD è una forma di apoptosi che si ha in seguito all'attivazione del linfocita T dovuta al legame di un antigene o di un mitogeno al suo TCR, per esempio durante la maturazione nel timo (tolleranza centrale, selezione negativa) o quando un linfocita T maturo incontra in

periferia un antigene (tolleranza periferica). Per altri l'AICD riguarda la morte di linfociti T attivati sottoposti a ristimolazione *in vitro*, con lo scopo di indurre uno spegnimento della risposta immunitaria. Mutazioni a carico di CD95, rappresentate dal modello murino *lpr*, il quale presenta un'espressione alterata del recettore e linfoproliferazione, non mostra alterata selezione negativa a livello del timo, a dimostrazione del fatto che la tolleranza periferica e centrale sono regolate da due meccanismi differenti e probabilmente non riconducibili all'AICD. In ogni caso la marcata linfoproliferazione e il quadro autoimmune che si instaurano in caso di *knock out* di CD95 o CD95L nel topo e nei pazienti con ALPS, dimostra senza dubbio che la via estrinseca dell'apoptosi è coinvolta nella morte periferica dei linfociti T (Watanaba- Fukunaga R. et., 1992).

1.2.1 LE MALATTIE AUTOIMMUNI e I DIFETTI APOPTOTICI.

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.

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.

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 favorendo 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 non è noto. 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 contribuisce all'autoimmunizzazione.

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 di linfociti T doppi negativi (DN) CD4/CD8, TCR $\alpha\beta$ positivi (Straus SE. et al.,1999; Bleesing J. 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 ha proposto 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 è eseguita in base alla presenza di linfadenopatia non maligna, splenomegalia, presenza di linfociti T DN circolanti superiori all'2%, difetti dell'apoptosi da parte di linfociti attivati *in vitro* (Lopatin U. et al.,2001). Questi linfociti T DN si pensa che derivano da linfociti T attivati i quali non vanno incontro a morte cellulare programmata in seguito alla loro riattivazione mediata dal TCR (Renno T. et al., 1998). 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.

Recentemente è stata identificata una forma della malattia con mutazioni a carico del gene di N-Ras, denominata ALPS IV, la quale non presenta difetti a carico del sistema Fas-FasL, ma coinvolge la via del mitocondrio (Oliveira B. et al.,2007). Tuttavia ancora sono molti i casi di

ALPS in cui non si conosce il difetto genetico, identificati come ALPS III, a supporto del fatto che altri fattori non ancora noti sono coinvolti nello sviluppo della malattia.

Il modello animale dell'ALPS è rappresentato dai topi MLR *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^{cg}* 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 (Th) 2 con ridotta produzione di IL (Interleuchina)-2 e IFN- γ 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 e la crescita di linfociti B con successiva produzione di auto-anticorpi (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 CE. 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 questo lavoro valuta il coinvolgimento di TIMP-1 nello sviluppo di questa malattia autoimmune.

1.3.1 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 (Metalloproteinasi). In particolare TIMP-1 inibisce in maniera specifica le MMPs-3-7 e 9 (Avalos BR. et al.,1988; Visse R. et al.,2003).

Le MMPs sono coinvolte 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 il cancro (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 differenziamento 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 (di 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 regolarne 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 (*Transforming Growth Factor*) β , IL-1 β , 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 S. et al.,1995).

Recentemente è stato identificato il recettore di TIMP-1, mediante un sistema di doppio ibrido in lievito, CD63 (Chirco R. et al.,2006).

1.3.2 TIMP-1 E CD63.

CD63 è un membro della famiglia delle tetraspannine, le quali interagiscono con diverse proteine quali integrine, immunoglobuline e recettori per fattori di crescita. Le tetraspannine controllano diversi processi biologici tra i quali: l'adesione, la migrazione cellulare e la formazione delle sinapsi (Levy S. et al.,2005). CD63 è una proteina integrale di membrana

con 2 domini extracellulari glicosilati e una corta porzione citoplasmatica. È presente a livello degli endosomi tardivi, delle vescicole secretorie e dei lisosomi.

Mediante un sistema di doppio ibrido in lievito è stato dimostrato che CD63 interagisce con TIMP-1 identificando un nuovo *pathway* di sopravvivenza modulando il complesso integrine-tetraspannine (Jung K. et al.,2006). CD63 è espresso sulla superficie delle cellule dendritiche ed è coinvolto nel processo di internalizzazione degli antigeni (Mantegazza A. et al.,2004).

È stato dimostrato, in cellule epiteliali umani, che TIMP-1 legando CD63 forma un complesso con l'integrina $\beta 1$ espressa 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 (*Protein Kinase B*). 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_L 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 un'aumentata espressione di CD63 nei linfociti T attivati ed è stato ipotizzato che CD63 può funzionare da molecola co-stimolatoria e trasmettere segnali di sopravvivenza, quando stimolata da un anticorpo anti-CD63 (Pfistershammer K. et al.,2004).

1.3.3 FUNZIONI BIOLOGICHE DI TIMP-1.

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 β , TNF- α o LPS (lipopolisaccaride) 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 XW. et al.,2005; Okuyama S. et al.,2005). Infatti è noto che TRAIL favorisce l'attività citotossica, mediata dalle cellule NK (*Natural Killer*) 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^{KIP1}, inibitore della chinasi associata alla ciclina, a cui segue una diminuzione della fosforilazione di pRb (proteina del retinoblastoma) (Taube ME. et al.,2006). A questi eventi segue un arresto del ciclo cellulare in fase G1.

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_L 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. Sempre in cellule di linfoma di Burkitt il trattamento con TIMP-1 ricombinante riduce la suscettibilità all'apoptosi sopprimendo l'attività di caspasi 3 e sostenendo la sintesi del DNA (Guedez L. et al., 1998).

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 Bcl₂, noto inibitore della via intrinseca dell'apoptosi, in seguito ad un'attivazione costitutiva di Fak. Invece nei linfociti B, inibisce l'apoptosi inducendo l'espressione di Bcl-X_L 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 (Gaudin P. et al.,2000; Ritter LM. et al.,1999).

1.3.4 TIMP-1 E LE MALATTIE AUTOIMMUNI.

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 cellule β 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 (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) 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 e colleghi hanno dimostrato che un aumento dell'mRNA di TIMP-1 nei PBMC di pazienti affetti da sclerosi multipla, contrasta l'effetto delle MMP-9 riducendo 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 stata riscontrata un'elevata produzione di IL-10 nel siero ed è frequente lo sviluppo di linfomi. In passato abbiamo dimostrato che un fattore coinvolto nella patogenesi dell'ALPS è Osteopontina.

1.4 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 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 R¹⁶⁸ S¹⁶⁹. In particolare in seguito al taglio proteolitico operato dalla 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 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_{v6-7} (Denhardt DT. et al.,2001; O'Regan A. et al.,2000). CD44 è una proteina di membrana glicosilata, coinvolta nell'adesione e nell'*homing* dei linfociti. L'espressione di CD44 è controllata dalle MMPs e da TIMP-1 (Kim S. et al.,2008). Attraverso il legame con questo recettore favorisce la secrezione di IL-12 e inibisce 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 è 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 903bp che presenta una delezione di 14 amminoacidi nell'esone 5 e OPNc di 864bp che presenta una delezione di 28 amminoacidi 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- α 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 LPS, 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 un'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 differenziare, favorisce la produzione di INF- γ 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 (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 tumorigenesi, 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 *knock-out* 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^{+/+}) ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associato 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, modello sperimentale della sclerosi multipla, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type* (Blom T. et al.,2003; Hur EM. et al.,2007). OPN è una citochina chiave nell'EAE in quanto, ligando delle integrine αV , regola l'attività degli oligodendrociti, principali responsabile del processo di rimielizzazione e favorisce la formazione della mielina (Zhao C. et al.,2008).

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 E₂. 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 dell'autoimmunità nell'uomo sono molteplici (Bird L.,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 gene di OPN, hanno identificato 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 della 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 LES (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.

2. SCOPO DEL LAVORO.

Questo lavoro valuta il coinvolgimento di TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS/DALD. Utilizzando un macroarray a cDNA è stata rilevata l'iperpressione dell'mRNA di TIMP-1 e OPN, in una paziente con DALD rispetto al fratello sano e questo dato è stato confermato anche in Real-Time PCR. In un lavoro precedente abbiamo descritto il ruolo di OPN nello sviluppo della DALD e l'associazione con particolari polimorfismi presenti nel gene (Chiocchetti A. et al.,2004). Per generalizzare il dato ottenuto, sono stati valutati i livelli sierici di TIMP-1 in altri pazienti con ALPS/ DALD, rispetto ai controlli sani. Abbiamo poi valutato se gli elevati livelli di TIMP-1 fossero associati a polimorfismi nel gene di TIMP-1, al fine di ricercare variazioni associate alla malattia. Visti gli elevati livelli sierici di entrambe le citochine, abbiamo testato l'effetto di OPN ricombinante (rOPN) sulla produzione di TIMP-1, in colture di PBMC ottenuti da donatori sani. Per primo sono stati valutati i livelli dell'mRNA di TIMP-1, nei lisati cellulari di PBMC dopo stimolazione con rOPN. In seguito sono stati dosati i livelli proteici di TIMP-1, secreto nei surnatanti delle colture di PBMC, dopo stimolazione con diverse concentrazioni di rOPN per tempi differenti. Abbiamo poi verificato quali popolazioni cellulari fossero responsabili della produzione di TIMP-1, in particolare in colture di linfociti T CD4⁺ o CD8⁺, linfociti B CD19⁺ e monociti CD14⁺. Infine è stato valutato il ruolo anti-apoptotico di TIMP-1, valutando l'effetto di TIMP-1 ricombinante (rTIMP-1), nell'AICD (*Activation Induced Cell Death*) e nella FICD (*Fas Induced Cell Death*). Per confermare la specificità del nostro risultato entrambi i test sono stati condotti anche in presenza di un anticorpo neutralizzante TIMP-1. Infine, per verificare se in queste condizioni sperimentali fosse coinvolta la capacità di TIMP-1 di inibire le MMPs l'AICD è stata allestita anche utilizzando una forma di TIMP-1 alchilato.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI.

In questo lavoro abbiamo analizzato 32 pazienti (10 femmine e 22 maschi), di cui 11 ALPS e 21 DALD, provenienti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino. Inoltre abbiamo analizzato 50 controlli sani confrontabili con i pazienti per sesso (17 femmine e 33 maschi), reclutati presso il dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Novara.

La diagnosi di malattia dei pazienti con ALPS è basata sui seguenti criteri: manifestazioni autoimmuni, citopenia di origine autoimmune che coinvolge una o più linee di cellule ematiche, linfadenopatia cronica non maligna (aumento di almeno 2 cm del diametro di due o più linfonodi) e/o splenomegalia, difetto di apoptosi indotta da Fas *in vitro* e presenza di mutazioni nei geni di Fas, FasL, caspasi10 e/o espansione di linfociti doppi negativi (DN) CD4-CD8, TCR $\alpha\beta$ positivi superiori all'2%. I pazienti con DALD non presentano linfociti T DN. I campioni di siero e di sangue sono stati prelevati dai controlli e dai pazienti, con il loro consenso scritto e informato. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida proposte dalla commissione etica locale.

3.2 ANALISI CON MACROARRAY.

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 2 μ g di RNA totale, estratto da PBMCs tenuti in coltura per 6 giorni in presenza di PHA (Fitoematoagglutinina) (1 μ g/ml) e IL-2 (10 U/ml) e retrotrascritto, secondo le indicazioni fornite dal kit. Le membrane sono state pre-ibridizzate per 2 ore a 65⁰C, denaturate, marcate con ³²P e incubate a 65⁰C 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 65⁰C per 30 minuti e analizzate al Phosphoimage scanner (BioRad, Hecules, CA).

3.3 ANALISI DEL GENE DI TIMP-1.

200ng di DNA genomico è stato utilizzato come template per l'amplificazione. Dei polimorfismi presenti nel gene di TIMP-1, descritti nella popolazione caucasica, abbiamo riscontrato la presenza di 5 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*): uno nell'introne 4, uno

nell'esone 5, uno nell'introne 5 e due nel 3'UTR. Questi polimorfismi sono stati analizzati utilizzando i seguenti primers: 5F (5'-CGCGGC CTAGCAACCACGAG -3') e 5R (5'-GGCTCAGGAACGGGGAGTGG -3'), 3F (5'-TTCCTATACTGATTCCTAATTGC-3') e 3R (5'-CCTTCCAAGTTGGTCAGAGG-3'), per gli SNPs nel 3'UTR. Le condizioni di PCR prevedono 35 cicli con 94⁰C per 15 sec 63⁰C per 15 sec e 72⁰C per 30 sec seguiti da un ciclo a 72⁰C per 5 min. Il prodotto di PCR è stato purificato con gli enzimi Exo-Sap e 30ng del prodotto di purificazione sono stati sequenziati con il primer 5F o 3R. Il sequenziamento è stato condotto impiegando il reagente PRISMTMBigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, CS) in un sequenziatore automatico (Applied Biosystem 3100 (Genetic Analyzer). Le sequenze sono state analizzate con il software ABI Prism[®] DNA 3.7 (Applied Biosystem).

3.4 SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO.

Per la separazione delle 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 Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, 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-Glutammina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA). Le cellule sono state contaminate mediante colorante Blu di Tripiano.

3.5 PURIFICAZIONE DI LINFOCITI T CD4⁺ E CD8⁺, LIFOCITI B CD19⁺ E MONOCITI CD14⁺.

Per la purificazione dei linfociti T CD4⁺ o CD8⁺ e dei monociti CD14⁺ è stato utilizzato un kit commerciale (Milteniy-Biotec, Germany), il quale permette di effettuare una selezione negativa di non linfociti T o non monociti, sfruttando anticorpi biotinilati successivamente coniugati ad anticorpi anti-biotina, legati a biglie magnetiche. Le cellule marcate ritenute nella colonna sono state eliminate, mentre le cellule non marcate di nostro interesse sono state eluite. La purezza delle cellule è stata valutata per mezzo di analisi immunofenotipiche ed è risultata sempre superiore al 95%. I linfociti B sono stati purificati dalle tonsille di bambini

sottoposti a tonsillectomia utilizzando un gradiente discontinuo di Percoll come già descritto (Dono MV. et al.,1996). 0.5×10^6 di cellule state trattate o meno per 48 ore con rOPN 1 $\mu\text{g/ml}$ per valutare la secrezione di TIMP-1 in ELISA. I monociti sono stati stimolati con rOPN anche in presenza di 10 $\mu\text{g/ml}$ di anticorpo neutralizzante OPN (R&D system, Minneapolis, USA) per 48 ore.

3.6 RT-PCR e REAL-TIME.

Per gli esperimenti di Real-Time è stato isolato l'RNA totale da colture di PBMC, utilizzando un kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany). L'RNA (500ng) è stato retrotrascritto con il kit ThermoScript™ RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON Canada). L'espressione di TIMP-1 è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA Assay No. Hs99999139_m1). Il gene housekeeping GAPDH (Assay No. Hs99999905_m1) è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), ogni campione è stato analizzato in duplicato impiegando 0,5 μl di cDNA diluito, 10 μl di PCR master mix (Applied Biosystem) e 1 μl di Assay on Demand mix. Il ciclo di PCR utilizzato prevede 10 min a 95°C , seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 sec e a 60°C per 1 min. I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve standard.

3.7 SAGGI ELISA.

I livelli di TIMP-1 e OPN, 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 (R&D system, Minneapolis, USA e IBL, Germany). (Sensibilità del kit 0.110 ng/mL e 3,33 ng/mL). La densità ottica è stata misurata a 450 nm usando un lettore di piastra ottica. Il programma I-Smart è stato utilizzato per elaborare una curva standard.

3.8 SAGGI FUNZIONALI.

Per valutare i livelli trascrizionale di TIMP-1, 2×10^6 di PBMC sono stati stimolati con rOPN 1 $\mu\text{g/mL}$ per 6-16-24 ore e in seguito è stato estratto l'RNA. Al fine di valutare la secrezione di TIMP-1 sono stati condotti esperimenti tempo e dose dipendente. $0,2 \times 10^6$ di PBMC sono stati mantenuti in terreno di coltura per 12-24-48-72 ore in presenza o meno di rOPN 1 $\mu\text{g/ml}$. Oppure $0,2 \times 10^6$ di PBMC sono stati trattati o meno con dosi crescenti di rOPN 0,1-0,5-1-2,5-

5 µg/ml (R&D system, Minneapolis, USA) per 48 ore. Al tempo indicato i surnatanti sono stati raccolti e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi in ELISA. La morte cellulare spontanea è stata valutata in ogni condizione sperimentale mediante conta con Blue di tripiano e rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) seguendo le istruzioni del Kit (Cito-Tox One, Promega Madison, USA). Inoltre è stata valutata anche la percentuale di ogni tipo cellulare (CD14⁺, CD19-20⁺, CD4⁺, CD8⁺) mediante citometria.

3.9 INTRACELLULAR STAINING DI TIMP-1.

Per valutare la produzione di TIMP-1 intracellulare, 1×10^6 di monociti sono stati coltivati in terreno RPMI 10% FCS e 10 mM HEPES, con o senza rOPN 1 µg /mL per 6 ore in presenza di 10 µg /mL di Brefeldina A (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Dopo 6 ore di coltura, utilizzando un kit commerciale FIX&PERM® (Invitrogen, Carlsbad, USA), le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-CD14 coniugato in FITC (Fluoroisotiocianato) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) e dopo essere state fissate sono state quindi permeabilizzate e marcate con un anticorpo anti-TIMP-1 coniugato in PE (Ficoeritina) (R&D system, Minneapolis, USA). Le cellule sono state analizzate con lo strumento FACSCalibur (BD, Bioscience, California, USA).

3.10 SAGGI DI MORTE CELLULARE.

L'AICD (Activation Induced Cell Death) o la FICD (Fas Induced Cell Death) sono state valutate su linfociti T ottenuti da PBMC attivati con PHA 1 µg/ml al giorno 0 coltivati in RPMI1640 10% FBS addizionato di IL-2 2U/ml. Per il test di FICD le cellule sono state riattivate al giorno 12° con PHA 0,1 µg/ml. L'AICD è stata allestita al sesto giorno di coltura mentre la FICD al diciottesimo. Per il saggio di AICD i linfociti T sono stati piastrati in presenza di un anticorpo in adesione (anti-CD3 10 µg/ml), mentre per il saggio di FICD i linfociti T sono stati piastrati in presenza di un anticorpo solubile anti-Fas (1 µg/ml) (Clone CH11, Upstate). In entrambi i saggi le cellule ($5 \times 10^4/100 \mu l$) sono state coltivate in terreno RPMI1640 + 5%FBS + 1U/ml di IL-2 in presenza o assenza di differenti concentrazioni di rhTIMP-1 (1 µg/ml) per 16 ore. L'AICD è stata allestita anche in presenza di rhTIMP-1 alchilato (1 µg/ml), mentre entrambi i test sono stati eseguiti anche in presenza di un anticorpo neutralizzante rh-TIMP (3 µg/ml). Le cellule vive sono state contate mediante esclusione con Trypan Blue di quelle morte. Ogni saggio è stato condotto in triplicato e i

risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare così calcolata: (totale delle cellule vive in ogni pozzetto del saggio/totale cellule vive in ogni rispettivo pozzetto di controllo)X 100.

3.11 ANALISI STATISTICHE.

Per quello che riguarda i saggi ELISA, l'approssimazione ad una distribuzione normale della popolazione è stata testata con la statistica della simmetria. I valori sierici di TIMP-1 e OPN sono espressi come mediana e 25° e 75° percentile. Il test impiegato per paragonare i risultati ottenuti è stato il test non parametrici Mann-Whitney U-test, per dati non appaiati, mentre il test di Wilcoxon è stato utilizzato per l'analisi dei dati appaiati. Tutti i valori assunti delle p avevano due code e il *cut-off* di significatività è $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state effettuate impiegando il software GraphPad InStat (San Diego, California, USA).

4. RISULTATI

4.1 TIMP-1 e OPN sono iper-espressi in una paziente con DALD.

Utilizzando un macroarray a cDNA è stato possibile comparare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi o nell'attivazione cellulare, di una paziente con DALD e del fratello sano. L'mRNA è stato ottenuto da linfociti T mantenuti in coltura per 6 giorni in presenza di IL-2 e 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 è alterata nella paziente, ma in particolare i livelli trascrizionali di TIMP-1 e OPN (**Figura 1a**). L'iperepressione di TIMP-1 è stata confermata con la tecnica della Real-Time PCR, normalizzandone i livelli trascrizionali con quelli del gene della GAPDH. I risultati mostrano che i PBMCs della paziente, attivati con PHA, presentano livelli aumentati di TIMP-1 rispetto a quelli del fratello sano (**Figura 1b**). Questi dati ci hanno suggerito un possibile coinvolgimento di TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS/DALD, supportato anche dal fatto che, in un lavoro precedente abbiamo, dimostrato il coinvolgimento di OPN nello sviluppo della malattia (Chiocchetti A. et al., 2004).

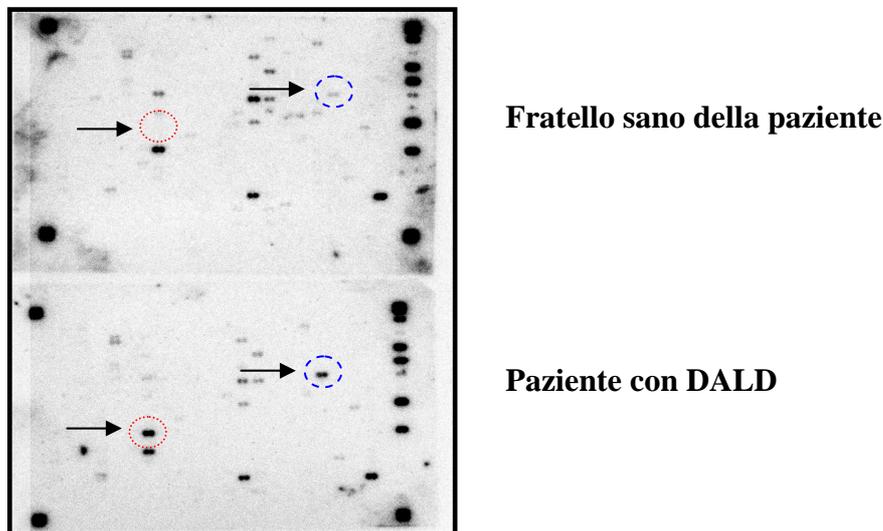


Figura 1a: Autoradiografia della membrana ibridizzata con il cDNA di una paziente con DALD e del fratello sano. Sono indicati gli spots che corrispondono al cDNA di TIMP-1 (linea tratteggiata) e di OPN (linea a puntini).

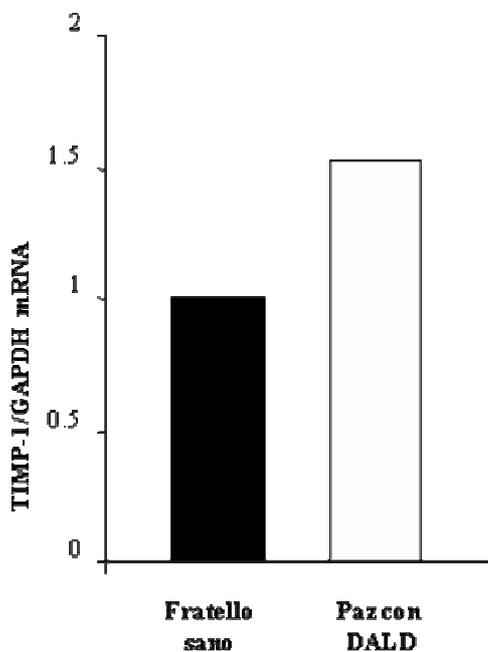


Figura 1b: Livelli trascrizionali TIMP-1 valutati in Real-Time PCR, in una paziente con DALD rispetto al fratello sano. I valori sono stati normalizzati a quelli del gene della GAPDH.

4.2 TIMP-1 è iper-espresso nel siero dei pazienti con ALPS e con DALD.

Al fine di generalizzare il dato ottenuto con il macroarray e la Real-Time PCR e spostare l'attenzione ai livelli proteici di TIMP-1, sono stati valutati i livelli sierici, mediante saggio ELISA, in altri pazienti con ALPS o DALD, e in alcuni controlli sani.

Sono stati dosati i livelli di TIMP-1 i nel siero di 11 pazienti con ALPS, 21 pazienti con DALD e 50 controlli sani. I risultati mostrano che i livelli di TIMP-1 sono superiori di 1,5 volte nei pazienti con ALPS e DALD [mediana 131=ng/ml; 25°-75° percentile 119-164 ng/ml] rispetto ai controlli sani [mediana = 83 ng/ml, 25°-75° percentile 56-110 ng/ml] ($p < 0.0001$). I livelli di TIMP-1 sono simili nei due gruppi di pazienti [ALPS mediana = 132 ng/ml, 25°-75° percentile 117-171 ng/ml); DALD mediana = 131 ng/ml, 25°-75° percentile 122-141 ng/ml) (per ogni gruppo $p < 0.0001$)] (**Figura 2**).

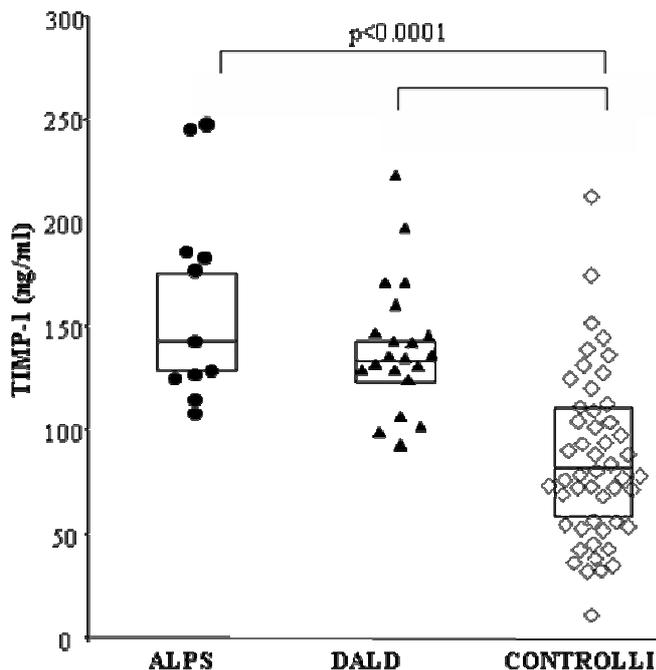


Figura 2: Concentrazione sierica di TIMP-1 (ng/ml) in 32 pazienti (11 con ALPS e 21 con DALD) e 50 controlli sani. Le linee in nero rappresentano la mediana. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA.

4.3 Analisi del gene di TIMP-1.

Per valutare se i livelli elevati di TIMP-1 fossero dovuti a delle varianti nel suo gene, sono stati sequenziati gli esoni e le giunzioni introne-esone del gene di TIMP-1, in tutti i pazienti con ALPS/DALD e nei controlli. Di tutti i polimorfismi descritti nella popolazione caucasica, nel nostro studio sono stati presi in esame i 5 descritti nella **Tabella 1**. Tuttavia i risultati ottenuti relativi alle frequenze genotipiche ed alleliche di questi polimorfismi, non presentano nessuna differenza significativa tra pazienti e controlli e non correlano con gli elevati livelli di TIMP-1 (dati non mostrati). Questo ci fa supporre che gli elevati livelli di TIMP-1 non hanno basi genetiche.

Tabella 1.

	SNP	posizione	ref*
1	IVS4+478 G>C	introne 4	rs 5953060
2	+372 T>C	esone 5	rs 4898
3	IVS5+673 A>G	introne 5	rs 6609533
4	+1053 G>T	3'UTR	rs 2070584
5	+1187 G>A	3'UTR	rs 6609534

* <http://snpper.chip.org> +1 dall' ATG.

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

In un lavoro precedente abbiamo dimostrato che anche i livelli sierici di OPN sono significativamente più elevati nei pazienti [ALPS mediana =230 ng/ml, DALD mediana= 250 ng/ml], rispetto ai controlli sani [mediana =142 ng/ml, (p<0.05 e p<0.001, rispettivamente)].

Dal momento che sia TIMP-1 che OPN sono iperespressi nei pazienti con ALPS/DALD, è stata ricercato una correlazione funzionale tra le due citochine, entrambe coinvolte nella risposta infiammatoria.

A questo scopo abbiamo verificato se i OPN ricombinante potesse influenzare direttamente l'espressione di TIMP-1 *in vitro*.

Inizialmente sono stati valutati i livelli trascrizionali di TIMP-1, su lisati cellulari di PBMC ottenuti da donatori sani, stimolati con rOPN 1µg/ml per 6-16-24 ore. I dati ottenuti in Real-Time PCR dimostrano che rOPN induce in maniera significativa (p<0.05) la trascrizione

dell'mRNA di TIMP-1, già dopo 6 ore di trattamento, rispetto alle cellule non trattate, mentre decresce nelle successive 16 e 24 ore (**Figura 3a**).

In seguito sono stati valutati in ELISA, i livelli di TIMP-1 secreti nei surnatanti delle colture di PBMC, allestendo degli esperimenti tempo e dose dipendente. I PBMC sono stati stimolati o meno con rOPN 1 μ g/ml per 12-24-48-72 ore. I risultati mostrano che il trattamento con rOPN 1 μ g/ml induce significativamente la produzione di TIMP-1 del 50% nelle prime 24-48 ore ($p < 0.05$) e non decresce durante le successive 72 ore di stimolo ($p < 0.01$) (**Figura 3b**). Inoltre ad ogni tempo preso in esame è stata valutata la percentuale delle differenti popolazioni cellulari in citofluorimetria, al fine di escludere che l'effetto osservato non fosse dovuto ad una espansione di una particolare sottopopolazione cellulare e non al trattamento con OPN. Tuttavia non è stato riscontrato nessun aumento significativo di una particolare popolazione cellulare (dati non mostrati).

In ultimo sono stati allestiti anche esperimenti dose dipendente, trattando i PBMC in presenza o meno di crescenti concentrazione di rOPN (0,1-0,5-1-2,5-5 μ g/ml) per 48 ore. I risultati mostrano un significativo effetto dose dipendente ($p < 0.05$) e che rOPN alla dose di 5 μ g/ml aumenta la secrezione di TIMP-1 di 2,5 volte ($p < 0.01$) (**Figura 3c**). Questi dati dimostrano che rOPN induce l'espressione di TIMP-1 *in vitro*. Inoltre abbiamo verificato che l'effetto di OPN sulla secrezione di TIMP-1 non fosse dovuto alla capacità di TIMP-1 di inibire l'apoptosi, come dimostrato invece da Guedez L. et al. Infatti la conta delle cellule vive, valutata con Blu di Tripano e la valutazione del rilascio di LDH, non variano in ogni condizione sperimentale (dati non mostrati).

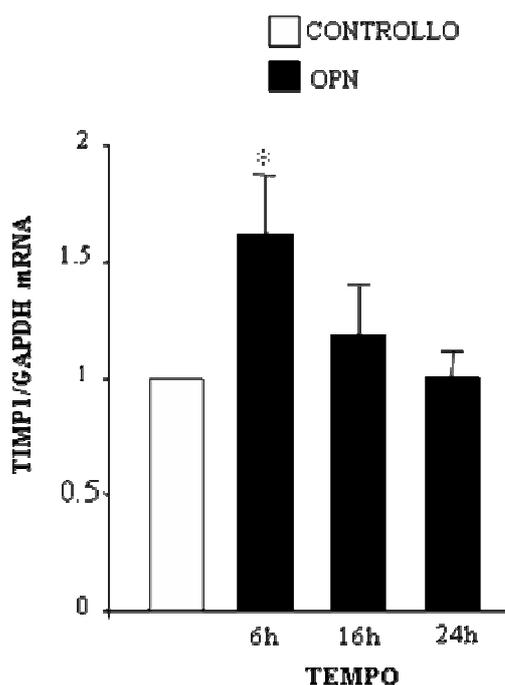


Figura 3a: Livelli trascrizionali di TIMP-1 dopo stimolazione con rOPN 1 μ g/ml in colture di PBMC. I livelli dell'mRNA di TIMP-1 sono stati valutati in Real-Time PCR dopo 6-16-24 ore di trattamento e normalizzati rispetto al gene della GAPDH. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

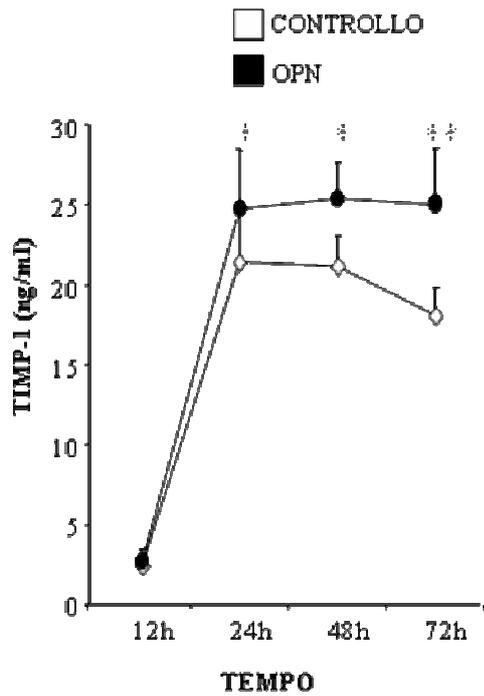


Figura 3b: Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con rOPN 1 μ g/ml. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 12-24-48-72 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

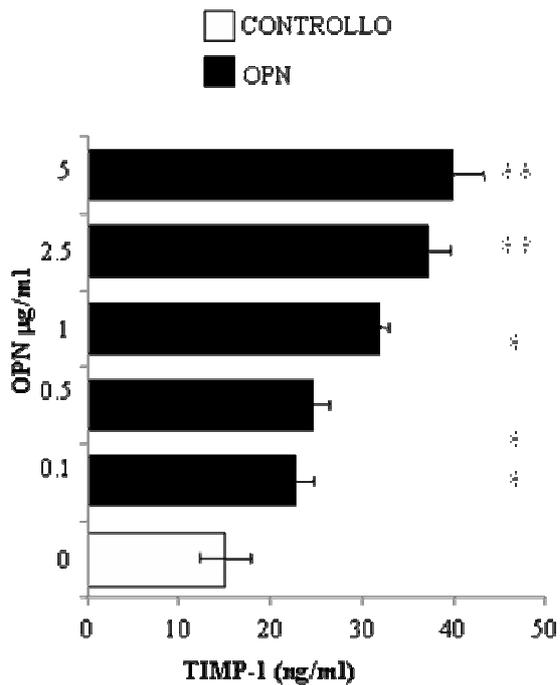


Figura 3c: Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con rOPN 0,1-0,5-1-2,5-5 μ g/ml. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 48 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

4.5 I monociti sono i principali produttori di TIMP-1.

Al fine di identificare quale tipo cellulare fosse responsabile della produzione di TIMP-1, è stato testato l'effetto di rOPN su monociti CD14⁺, linfociti T CD4⁺ o CD8⁺ e linfociti B CD19⁺.

I diversi tipi cellulari sono stati trattati o meno con 1µg/ml di OPN per 48 ore. 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 in maniera significativa la secrezione di TIMP-1 nei monociti ($p=0,01$) mentre non ha nessun effetto sulle altre popolazioni cellulari prese in esame (**Figura 4a**). La specificità rOPN è stata testata allestendo degli esperimenti con monociti trattati con rOPN in presenza di 10 µg/ml di anticorpo neutralizzante rOPN. I risultati dimostrano che in presenza dell'anticorpo anti-OPN la produzione di TIMP-1 è significativamente abrogata ($p<0.05$) (**Figura 4a**).

Per confermare l'effetto di rOPN sulla produzione di TIMP-1 nei monociti, è stata valutata l'espressione di TIMP-1 intracellulare. I monociti sono stati stimolati con 1µg/ml di OPN o meno per 6 ore in presenza di 10µg/ml di Brefeldina A. Dopo 6 ore di coltura le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-CD14 coniugato in FITC e con un anticorpo anti-TIMP-1 coniugato in PE. Analisi citofluorimetriche confermano una produzione basale di TIMP-1, la quale è aumentata del 20% in seguito al trattamento con rOPN, rispetto alle cellule non trattate (**Figura 4b**).

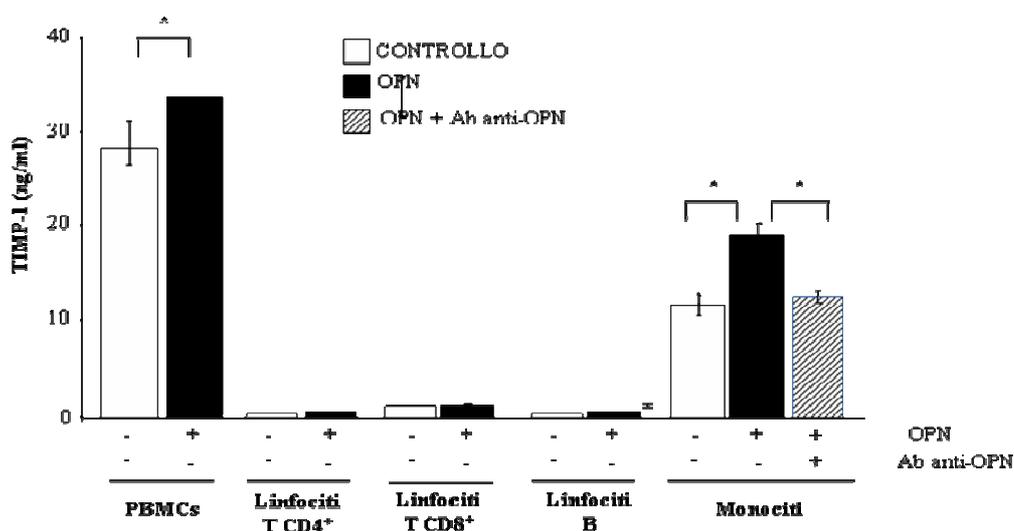


Figura 4a: Produzione di TIMP-1 da parte di differenti popolazioni cellulari dopo stimolazione con rOPN 1µg/ml. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 48 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test. I monociti sono stati stimolati anche in presenza di 10 µg/ml di anticorpo neutralizzante OPN per 48 ore.

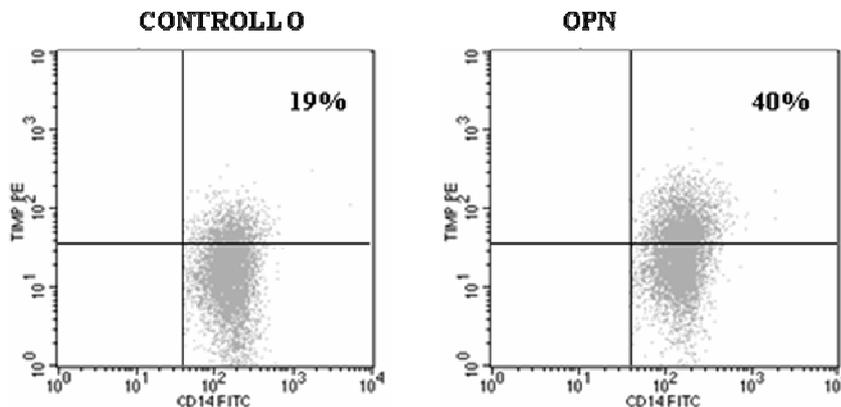


Figura 4b: Produzione di TIMP-1 intracellulare da monociti dopo stimolazione con rOPN 1 μ g/ml, in presenza di 10 μ g/ml di BrefeldinaA. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in citofluorimetria dopo 6 ore di stimolazione.

4.6 rTIMP-1 inibisce l'apoptosi dei linfociti T.

Dal momento che l'ALPS/DALD è una malattia autoimmune dovuta ad un difetto di morte cellulare che causa un accumulo di linfociti, e in passato abbiamo dimostrato che OPN concorre allo sviluppo della malattia inibendo l'AICD, abbiamo valutato se anche TIMP-1 è coinvolto nel deficit di apoptosi, testando l'effetto di rTIMP-1 nell'AICD e nella FICD.

I linfociti T sono stati ottenuti coltivando i PBMC di donatori sani, con IL2 e PHA per 6 o 18 giorni. L'AICD è stata valutata al sesto giorno stimolando le cellule con 10 μ g/ml di un anticorpo anti-CD3 in presenza o meno di rTIMP-1 1 μ g/ml, per 16 ore. Al diciottesimo giorno invece è stata valutata la FICD, trattando le cellule con 1 μ g/ml di un anticorpo anti-Fas, in presenza o meno di rTIMP-1 1 μ g/ml, per 16 ore. Dopo 16 ore le cellule sono state contate con il colorante Blu di Tripiano. I risultati dimostrano che le cellule coltivate in presenza di rTIMP-1 presentano livelli di AICD e FICD significativamente più bassi, rispetto a quelle non trattate con rTIMP-1 ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, rispettivamente) (**Figura 5a e 5b**). Per valutare la specificità di TIMP-1 gli esperimenti di AICD e FICD sono stati allestiti anche in presenza di un anticorpo neutralizzante rTIMP-1 (3 μ g/ml). I risultati ottenuti dimostrano che l'anticorpo anti-TIMP-1 annulla l'effetto di protezione della morte cellulare dovuto a rTIMP-1. Inoltre per valutare se l'effetto anti-apoptotico di TIMP-1 fosse dipendente dalla sua capacità di inibire le MMPs, l'AICD è stata allestita anche in presenza di 1 μ g/ml di TIMP-1 alchilato, il quale perde questa funzione. In questo caso l'effetto anti-apoptotico è stato comunque riscontrato a supporto del fatto che si tratta di un meccanismo MMP-indipendente (**Figura 5a**). I risultati ottenuti dimostrano come TIMP-1 possa concorrere allo sviluppo della malattia favorendo un accumulo di linfociti T attivati.

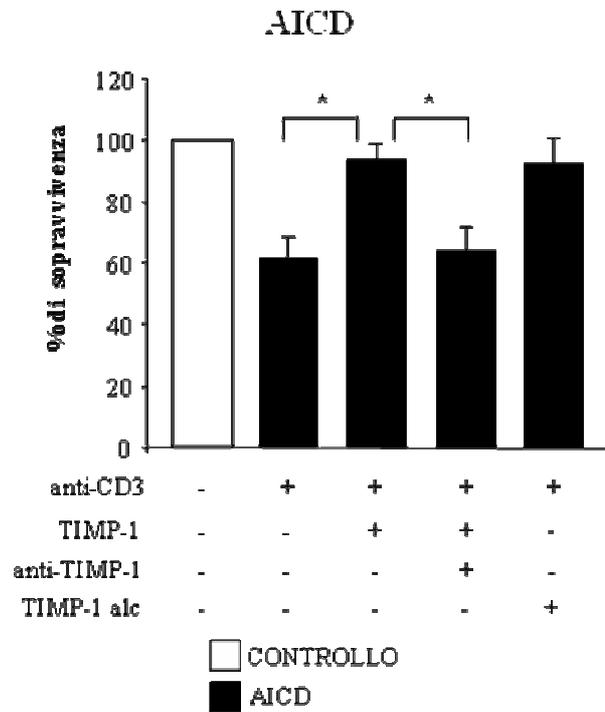


Figura 5a: % di sopravvivenza dei linfociti T mantenuti in coltura per 6 giorni. L'AICD è stata indotta con un anticorpo anti-CD3 10 µg/ml in presenza o in assenza di rTIMP-1 1 µg/ml per 16 ore. Il test è stato condotto anche in presenza di un anticorpo neutralizzante TIMP-1 3µg/ml e in presenza di 1 µg/ml della forma alchilata di rTIMP-1. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

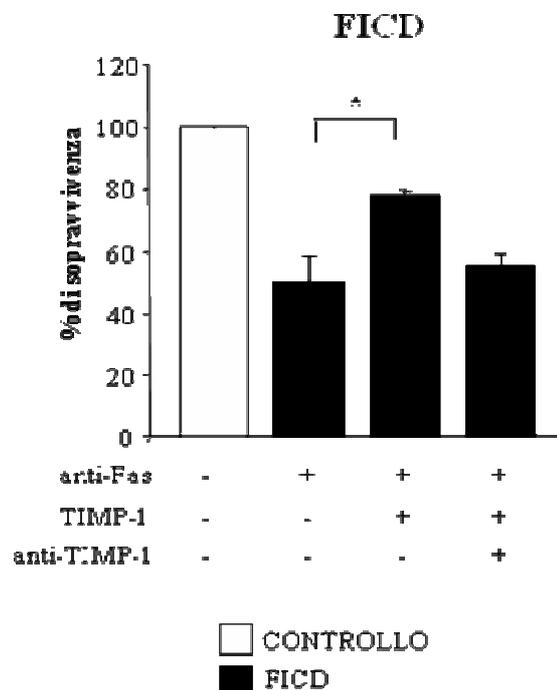


Figura 5b: % di sopravvivenza dei linfociti T mantenuti in coltura per 18 giorni. La FICD è stata indotta con un anticorpo anti-Fas 1 µg/ml, in presenza o in assenza di rTIMP-1 1 µg/ml per 16 ore. Il test è stato condotto anche in presenza di un anticorpo neutralizzante TIMP-1 3µg/ml. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

RISULTATI (2°parte)

Razionale

Recentemente è stato identificato un nuovo sotto tipo di linfociti T CD4⁺, identificati con il nome di T-helper 17 (Th17), i quali svolgono un ruolo cruciale nell'infiammazione. I linfociti Th17 sono considerati un gruppo distinto di linfociti effettori in quanto: 1) si differenziano a partire da linfociti T naïve CD4⁺ in presenza di particolari citochine; 2) la loro differenziazione è controllata da fattori trascrizionali specifici; 3) sono in grado di produrre specifiche citochine. La citochina chiave prodotta da questo tipo di linfociti effettori è IL-17.

Alcuni anni fa è stata identificata una famiglia di citochine che comprende sei membri (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) e cinque recettori (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE). Le meglio caratterizzate fin'ora sono IL-17A e IL-17F, le quali legano gli stessi recettori (IL-17RA and IL-17RC). IL-17 è prodotta da differenti tipi cellulari, in particolare da linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, dalle cellule NK e dai neutrofili.

Il coinvolgimento dei linfociti Th17 in differenti malattie autoimmuni, quali la sclerosi multipla, il LES e l'artrite reumatoide e le caratteristiche pro-infiammatorie di IL-17, ci hanno suggerito un loro possibile ruolo nell'ALPS/DALD. Inoltre il topo MRL lpr presenta elevati livelli di IL-17, prodotti in gran parte dai linfociti T DN presenti a livello dei linfonodi. Tuttavia è stato dimostrato che IL-17 è in grado di favorire la produzione di IgG anti-DNAs, caratteristica clinica riscontrabili anche nei pazienti con ALPS/DALD.

Queste osservazioni ci hanno condotto, in primo luogo, a valutare i livelli sierici di IL-17 nei pazienti con ALPS/DALD e successivamente ad indagare il possibile ruolo di OPN sulla produzione di IL-17 *in vitro*, visto il suo coinvolgimento nella patogenesi della malattia, precedentemente descritto. Inoltre dati recenti di letteratura hanno dimostrato come OPN è in grado di favorire la produzione di IL-17, inibendo l'espressione di IL-27, noto inibitore di IL-17.

4.7 IL-17 è iper-espressa nel siero dei pazienti con ALPS e con DALD.

Sono stati dosati i livelli di IL-17 nel siero di 31 pazienti, 11 con ALPS, 20 con DALD e 50 controlli sani. I risultati mostrano che i livelli di IL-17 sono superiori nei pazienti con ALPS e DALD [mediana 40=pg/ml; 25°-75° percentile 23-105 pg/ml] rispetto ai controlli sani [mediana= 26 pg/ml, 25°-75° percentile 20-73 pg/ml ($p<0.05$)]. I livelli di IL-17 sono simili nei due gruppi di pazienti [ALPS mediana = 43 pg/ml, 25°-75° percentile 20-81 ng/ml ($p<0.05$); DALD mediana = 40 pg/ml, 25°-75° percentile 26-130 pg/ml ($p<0.01$)] (**Figura 6**).

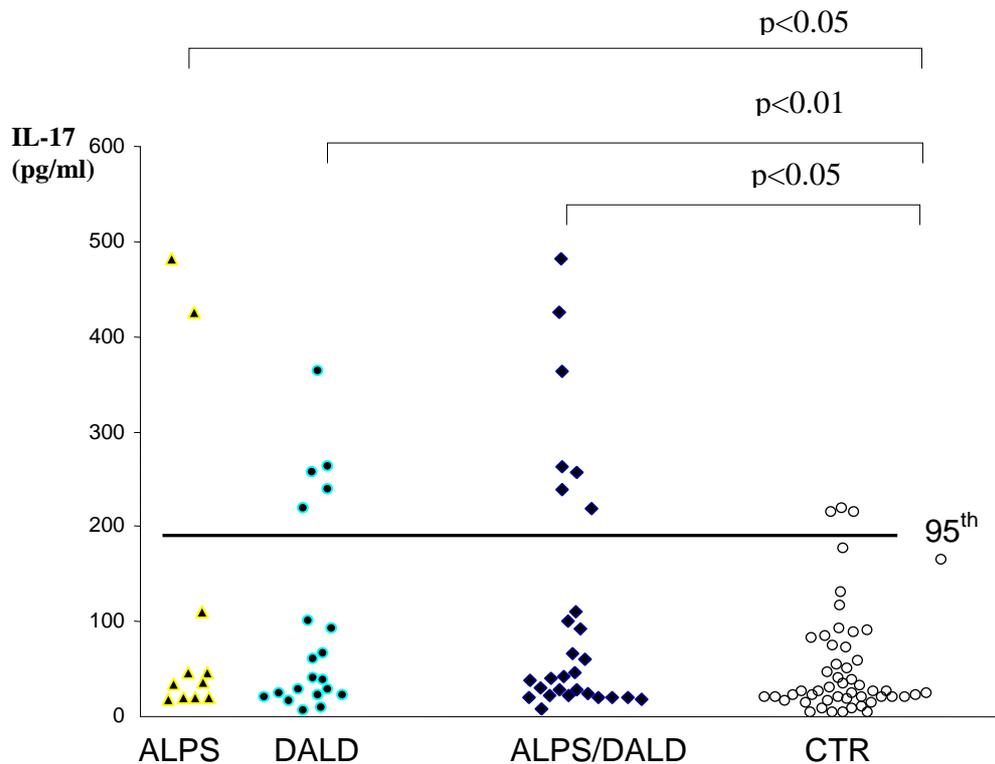


Figura 6: Concentrazione sierica di IL-17 (pg/ml) in 31 pazienti (11 con ALPS e 20 con DALD) e 50 controlli sani. La linea in nero rappresenta il 95°percentile dei controlli. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon. I livelli di IL-17 sono stati valutati in ELISA.

4.8 OPN ricombinante induce la produzione di IL-17 *in vitro*.

Dal momento che, in un lavoro precedente, abbiamo dimostrato che anche i livelli sierici di OPN sono significativamente più elevati, su base genetica, nei pazienti rispetto ai controlli sani, è stata ricercata una correlazione funzionale tra le due citochine, entrambe coinvolte nella risposta infiammatoria. A questo scopo abbiamo verificato se OPN ricombinante potesse influenzare la produzione di IL-17 *in vitro*. Inizialmente è stato testato l'effetto di rOPN in colture di linfociti T naïve CD4⁺, senza riscontrare alcun incremento della produzione di IL-17 dovuta al trattamento con rOPN (dato non mostrato). Successivamente sono stati valutati i livelli di IL-17 secreti nei surnatanti delle colture di linfociti T totali CD4⁺, attivati con un anticorpo anti-CD3 1 µg/ml, in presenza o meno di rOPN 1 µg/ml, per cinque giorni. I risultati mostrano che il trattamento con rOPN 1µg/ml induce in maniera significativa la produzione di IL-17 ($p < 0.05$). I risultati sono espressi come % di incremento della produzione di IL-17 (**Figura 7**). Al contrario, non è stato riscontrato nessun aumento della produzione di IL-17 indotta da rOPN, se i linfociti erano stati attivati in presenza di un anticorpo anti-CD28 (dato non mostrato).

Questi risultati permettono di concludere che rOPN mostra un effetto solo in presenza di linfociti memoria e non durante il differenziamento in senso Th17.

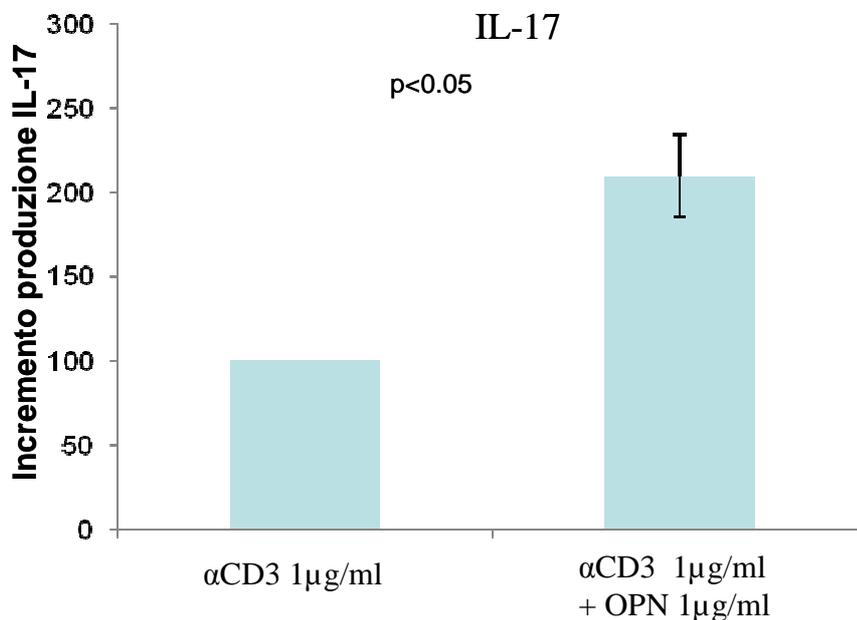


Figura 7: Incremento della produzione di IL-17 da parte di linfociti T totali CD4⁺ dopo stimolazione con rOPN 1µg/ml. La produzione di IL-17 senza OPN è stata normalizzata al 100%. I valori assoluti erano pari a: non trattato, media 290 pg/ml +/- DS 379 pg/ml; trattato con OPN: media 506 pg/ml +/- DS 610 pg/ml. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

4.9 OPN influenza la produzione di IFN γ e non quella di IL-4 e di IL-10.

Al fine di verificare se l'aumento di IL-17, in seguito al trattamento con rOPN, fosse specifico, e non avesse effetto anche su altre citochine di tipo Th1 o Th2, negli stessi surnatanti di coltura, sono stati valutati i livelli di IL-4, IL-10 e IFN γ . I risultati ottenuti in ELISA non hanno mostrato nessun aumento significativo della produzione di IL-4 e di IL-10 (**Figura 8a e 8b**). Tuttavia è stato osservato un aumento significativo della produzione di IFN γ ($p < 0.05$) in seguito al trattamento con rOPN, del resto è noto da tempo che OPN polarizza i linfociti anche in senso di Th1 (**Figura 8c**). I risultati sono espressi come % di incremento della produzione di IFN γ , IL-4 o IL-10. Questi dati suggeriscono che OPN è importante per potenziare la produzione di IL-17 e IFN γ , creando così un ambiente citochinico che favorisce l'autoimmunità.

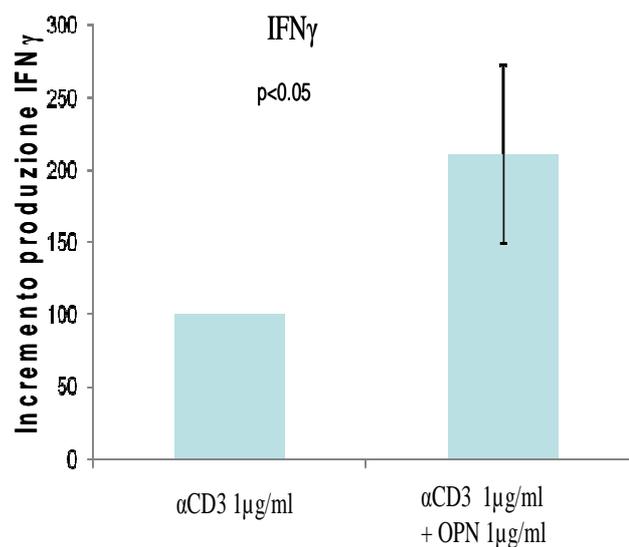


Figura 8a: Incremento della produzione di IFN γ da parte di linfociti T totali CD4⁺ dopo stimolazione con rOPN 1 μ g/ml. La produzione di IFN γ senza OPN è stata normalizzata al 100%. I valori assoluti erano pari a: non trattato, media 8,9 ng/ml +/- DS 18,3 ng/ml; trattato con OPN: media 11,8 ng/ml +/- DS 18,4 ng/ml. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

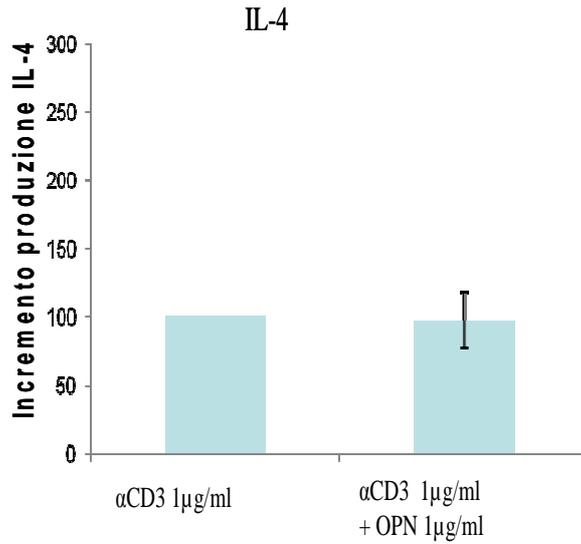


Figura 8b: Incremento della produzione di IL-4 da parte di linfociti T totali CD4⁺ dopo stimolazione con rOPN 1μg/ml. La produzione di IL-4 senza OPN è stata normalizzata al 100%. I valori assoluti erano pari a: non trattato, media 5,3 pg/ml +/- DS 5,2 pg/ml; trattato con OPN: media 5,7 pg/ml +/- DS 6,2 pg/ml: Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

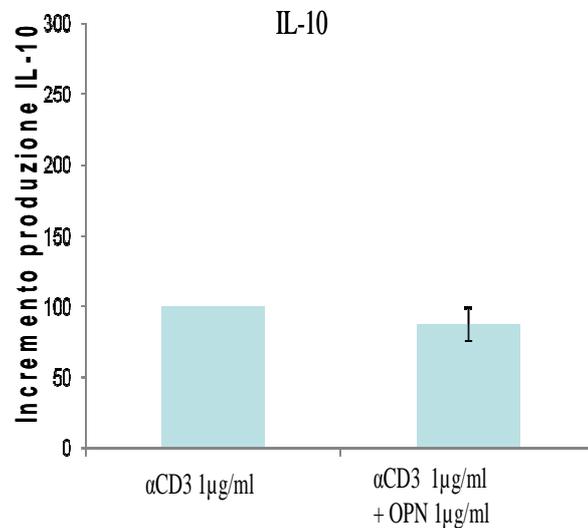


Figura 8c: Incremento della produzione di IL-10 da parte di linfociti T totali CD4⁺ dopo stimolazione con rOPN 1μg/ml. La produzione di IL-10 senza OPN è stata normalizzata al 100%. I valori assoluti erano pari a: non trattato, media 700 pg/ml +/- DS 222 pg/ml; trattato con OPN: media 477 pg/ml +/- DS 199 pg/ml: Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

5. DISCUSSIONE

Questo lavoro dimostra che i livelli di TIMP-1 sono aumentati nei pazienti con ALPS/DALD e che possono essere coinvolti nel difetto apoptotico dei linfociti T, contribuendo allo sviluppo della malattia. Questo è supportato dai dati *in vitro* che dimostrano che TIMP-1 è in grado di inibire l'AICD e la FICD di linfociti T attivati, come altri autori hanno dimostrato inibire l'apoptosi di linfociti B, Fas dipendente e indipendente. La concentrazione di TIMP-1 utilizzata *in vitro* è superiore a quella rilevata nel siero dei pazienti ma questo è spiegabile con il fatto che la concentrazione di TIMP-1 a livello dei tessuti linfoidei secondari è superiore a quella dosata nel siero. L'effetto di TIMP-1 nell'inibire l'apoptosi è indipendente dalla sua capacità di inibire le MMPs in quanto, esperimenti di AICD e FICD condotti in presenza di TIMP-1 alchilato, il quale è noto perdere la sua attività inibitoria per le MMPs, previene la morte cellulare. L'effetto potrebbe essere mediato invece dal coinvolgimento di CD63, noto ligando di TIMP-1, membro della famiglia delle tetraspannine, spesso utilizzato come *marker* degli endosomi tardivi, ma espresso anche da diversi tipi cellulari, tra questi anche linfociti T attivati. CD63 a livello dei linfociti T funziona come molecola costimolatoria e trasmette segnali anti-apoptotici in diversi tipi cellulari (Pfistershammer K. et al.,2006).

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 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 8-10), ALPS-IV con mutazione di n-Ras e normale funzionalità di Fas. 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 sono probabilmente coinvolti nello sviluppo dell'ALPS.

In questo lavoro abbiamo posto la nostra attenzione su TIMP-1 poiché, mediante macroarray a cDNA e Real-Time PCR, è stata identificata una paziente con DALD, in cui i livelli trascrizionali sono elevati, rispetto al fratello sano. Inoltre la stessa paziente presenta anche elevati livelli di OPN, dovuto in parte alla presenza di differenti genotipi, i quali favoriscono

l'insorgere della malattia inibendo l'AICD, una morte dei linfociti T attivati in parte Fas indipendente (Chiocchetti A. et al, 2004).

Questi dati suggeriscono che TIMP-1 contribuisce ai difetti apoptotici tipici della malattia in collaborazione con altri fattori identificati nel nostro laboratorio quali, OPN e perforina.

Del resto il meccanismo di inibizione dell'apoptosi mediato da TIMP-1 potrebbe essere indipendente da quello mediato da OPN in quanto l'effetto osservato in presenza di TIMP-1 riguarda linfociti T i quali non secernono TIMP-1, in seguito al trattamento con OPN. Perforina è una proteina contenuta nei granuli citolitici delle cellule citotossiche ed è coinvolta nel mediare l'apoptosi di differenti cellule *target*. Mutazioni bialleliche a carico del gene di perforina compromettono la citotossicità cellulo-mediata e la *clearence* virale causando linfoistocitosi emofagocitica familiare, una severa immunodeficienza con aspetti di linfoproliferazione. In un lavoro precedente abbiamo identificati mutazioni a carico di perforina che favoriscono lo sviluppo dell'ALPS-DALD, probabilmente dovuto al fatto che la citotossicità cellulo-mediata è coinvolta nello spegnimento della risposta immunitaria eliminando i linfociti attivati. Uno studio recente ha dimostrato come l'AICD mediata da perforina potrebbe in parte compensare il difetto apoptotico tipico dei pazienti con ALPS (Mateo V. et al., 2007). È interessante notare che anche rTIMP-1 è in grado di inibire la citotossicità cellulo-mediata in colture miste di linfociti alloreattivi. Inoltre il recettore di TIMP-1 CD63 è espresso a livello dei granuli citolitici delle cellule citotossiche e la sua espressione risulta aumentata nelle cellule citotossiche attivate (Oelmann L. et al., 2007).

Al fine di approfondire l'iperespressione di TIMP-1, abbiamo esteso l'analisi dei livelli sierici di TIMP-1 in altri 32 pazienti con ALPS-DALD e in 50 controlli. I dati ottenuti dimostrano che i pazienti con ALPS-DALD presentano livelli di TIMP-1 significativamente più elevati rispetto ai controlli sani. Quindi questi dati suggeriscono un possibile coinvolgimento di questa citochina nella patogenesi dell'ALPS-DALD. Al fine di spiegare gli elevati livelli di TIMP-1 nei pazienti abbiamo sequenziato il gene di TIMP-1 in tutti i pazienti e nei controlli, per ricercare polimorfismi associati all'ALPS-DALD. Tuttavia sia le frequenze geniche che aploipiche non hanno dimostrato differenze significative tra i pazienti e i controlli. In letteratura è presente un lavoro in cui è stato dimostrato che la variante +372C nel gene di TIMP-1 è associata a pazienti maschi italiani affetti da sclerodermia sistemica, mentre nessuna associazione è presente nel gruppo di pazienti femmine (Indelicato M. et al., 2006). Nel nostro studio è stata rilevata la stessa distribuzione allelica tra pazienti e controlli ma nessuna associazione con il sesso.

La concomitante presenza di elevati livelli di OPN e TIMP-1 ci ha indotto a ricercare una correlazione funzionale tra queste due citochine. Al fine di valutare il ruolo di OPN sull'espressione di TIMP-1 abbiamo testato l'effetto di OPN ricombinate. Inizialmente abbiamo valutato i livelli trascrizionali di TIMP-1 in colture di PBMC dopo stimolazione con rOPN e abbiamo riscontrato aumentati livelli dell'mRNA di TIMP-1 già dopo 6 ore di trattamento.

In seguito abbiamo analizzato i livelli proteici di TIMP-1 e i risultati ottenuti dopo trattamento con rOPN per differenti tempi e a differenti concentrazioni, hanno dimostrato un'induzione della produzione di TIMP-1 dopo 24-48 ore di trattamento, mentre non è stato riscontrato nessun effetto a tempi più brevi ed è stato rilevato un effetto dose dipendente.

Abbiamo poi valutato quale popolazione cellulare fosse responsabile della produzione di TIMP-1. 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 non ha nessun effetto e inoltre abbiamo dimostrato la specificità di OPN dal momento che, la produzione di TIMP-1 è abrogata se il trattamento avviene in presenza di un anticorpo neutralizzante OPN. In seguito nei monociti abbiamo valutato la produzione intracellulare di TIMP-1 e abbiamo dimostrato che i livelli intracellulari di TIMP-1 aumentano del 20% dopo 6 ore di trattamento con rOPN, rispetto alle cellule non trattate. Infine abbiamo valutato il ruolo anti-apoptotico di TIMP-1, dal momento che l'ALPS è una malattia autoimmune che presenta difetti apoptotici.

Oltre a contribuire al difetto apoptotico, TIMP-1 potrebbe favorire lo sviluppo dell'ALPS supportando l'ipergammaglobulinemia, frequente nei pazienti con ALPS, dal momento che regola il differenziamento dei linfociti B e induce l'espressione di IL-10, la quale agisce come fattore di crescita dei linfociti B attivati e promuove la loro maturazione in plasmacellule (Guedez L. et al., 2004 e 2005). Inoltre il topo trasgenico per OPN, elevata nei pazienti con ALPS su base genetica, presenta elevati livelli di IL-10 e ipergammaglobulinemia, che può essere un secondo effetto dovuto agli elevati livelli di TIMP-1 e questo suggerisce così una possibile relazione tra OPN e TIMP-1 nello sviluppo dell'ALPS.

In conclusione questi dati suggeriscono che le varianti geniche di OPN associate all'ALPS che ne determinano elevati livelli, contribuiscono ai difetti apoptotici causando l'ALPS in due modi: inibendo l'AICD direttamente o inducendo elevati livelli di TIMP-1 che causano un'inibizione sia dell'AICD che della morte indotta da Fas. Questo studio apre nuove

possibilità terapeutiche per il trattamento dei pazienti con ALPS-DALD volti a inibire l'effetto di questi fattori che concorrono allo sviluppo della malattia.

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.

Bouillet P. and O'Reilly L. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nature*, 2009; 9:514519.

Krammer P., Arnold R. and Lavrik I. Life and death in peripheral T cells. *Nature Immun.* 2007;7:532542.

Brenner D., Golks A., Kiefer F., Kramme P. and Arnold R. Activation or suppression of NFkB by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death. *The EMBO Jour.*, 2005;24:4279-4290.

Brenner D., Golks A., Becker M., Muller W., Frey C., Novak R., Melamed D., Kiefer F. and Arnold R. Caspase cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood*, 2007

Zhang J., Xu X. and Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell. and Molec. Immun.*, 2004;1:186-192.

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.

Rieaux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995;268:1347-1349.

Watanabe-Fukunaga R., Brannan C., Copeland N., Jenkins N. and Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992, 356:314-317.

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-Laucat 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.

Rennò T., Hahne M. and MacDonald H. Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen-induced T cells apoptosis in vivo. *J. Exp. Med.*, 1995,181:2283-2287.

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 syndrome *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.

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.

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. Bonisconi, 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.

Visse R.; H. Nagase Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (structure, functions and biochemistry). *Circulation Reserch* 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.

Levy S and Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes *Nat. Immunol.*,2005; 5:136-148.

Mantegazza A., Barrio M., Moutel S., Bover L., Weck M., Brossart P., Teillaud J. And Mordoh J. Cd63 tetraspanin slows down cell migration and traslocate to the endosomal-lysosomal -MIICs route after extracellular stimuli in immature dendritic cells. *Blood*, 2004;104:1183-1190.

Jung K., Liu X., Chirco R., Fridman R. and Kim H. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO Journ.*, 2006;25:3934-3942.

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.

Ogier C., R, Creidy, J. Boucraut, PD: 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, Khrestchatisky 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^{Kip1} 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.

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 β 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.

Kim Y., seo D., Kong S., Lee J., Lee E., Stevenson M., Stevenson W. TIMP-1 induces CD44 expression and nuclear traslocation of SHP1 during the late centrocyte-port germinal center B cell differentiation. *Cancer Lett.*, 2008; in press.

Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL. et. al., Osteopontin, a novel substrate for trasglutminase and factor VIII activity. *Biochem. Biopys. 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 phosphatidylinositol 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-remodelling. *ExpOncol.*2004;26179-84.

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- γ 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, DT. 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 HA. 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.

Zhao C., Fancy S., Constant C. and Franklin R . Osteopontin is extensively expressed by macrophages following CNS demyelination but has a redundant role in remyelination. *Neurobiol. of Disease*, 2008; in press.

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.

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

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. Giordan, 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, Momigliano-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.

Dono M, Zupo S, Augliera A, et al. Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. Functional characterization. *Eur J Immun.* 1996;26:2043-2049.

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.

Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, André N Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood*. 2007; 110. :4285-92.

Indelicato M, Chiarenza V, Libra M, Malaponte G, Bevelacqua V, Marchini M, et al. Analysis of TIMP-1 gene polymorphisms in Italian sclerodermic patients. *J Clin Lab Anal.* 2006;20:173-76.

SEMINARI interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2008-2009

Production of biopharmaceuticals in plants

Prof. L. Santi

5/12/08

Utilizzo delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie neurologiche

Prof. A. Uccelli

12/12/08

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone

9/01/09

Porpora trombocitopenia autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Prof. F. Zaja

13/01/09

Interazioni geni-ambiente nell'eziologia della sclerosi multipla: studi su gemelli

Prof. M. Salvetti

27/01/09

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

Prof. A. Musarò

10/2/09

Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi

Prof.ssa. G. Bianchi Scarrà

12/2/09

The use of the cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian immunodeficiency virus

Prof. Jay A. Nelson

19/2/09

When a fine tuner of signaling pathway becomes a dangerous amplifier: the case of the proliferin Pin1 in cancer

Prof. G. Del Sal

20/2/09

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica

Prof. M. Maccarone

26/2/09

La proteomica un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine

Prof. P. Pucci

18/3/09

Cellule staminali tumorali implicazioni terapeutiche

Prof. G. Stassi

18/3/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. Peluso

19/3/09

Regulation of integrin functions in vascular system

Prof. F. Bussolino

26/3/09

Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia

Prof.ssa B. Biondi

2/4/09

I bioreattori nella medicina rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up

Dott.ssa S. Mantero

9/4/09

Patologie dei tumori neuro-cerebrali: recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi

Dott. D. Schiffer

22/4/09

Polycystin-1 , the product of the PDK1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Disease (ADPKD) is an orphan receptor regulating cell migration and polarity

Dott.ssa A. Boletta

28/4/09

Polarized inflammation in tumor development

Prof. A. Sica

30/4/09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo

Prof. A. Columbo

5/5/09

Integrated nanoparticle- biomolecule hybrid system: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy

Dott.ssa B. Palazzo

6/5/09

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana

Prof. G. Poli

12/5/09

Neurotossicità delle proteine misfolded nelle malattie del motoneurone
Prof. A. Poletti
12/5/09

Functional genomics of brain
Prof. S. Gustincich
13/5/09

Marcatori molecolari del carcinoma colo rettale: dalla terapia alla pratica clinica
Prof. M. Frattini
10/6/09

Il lupus eritematoso cutaneo: quadro clinico e immunopatologico
Prof. E. Berti
6/7/09

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:

th

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

6-9 giugno 2007, Trieste

th

6 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

11-14 giugno 2008, Roma

Parteciperò al 2nd Course in Integration of cytogenetics, microarrays and massive sequencing in biomedical and clinical research che si terrà dal 18 al 22 ottobre 2009 a Bologna.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

th

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.*

th

6 NATIONAL CONFERENCE SIICA ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY 11-14 giugno 2008, Roma

Comunicazione orale: E. Boggio, M. Indelicato, S. Nicola, U. Dianzani, C. Mazzarino and A. Chiocchetti; *The role of TIMP-1 in the development of autoimmunity-lymphoproliferative syndrome*

PUBBLICAZIONI

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, **Boggio E**, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, Barizzone N, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F Dianzani U. *Genes Immun.* 2008 Jul;9(5):438-44.

SERUM LEVEL OF OSTEOPONTIN ARE INCREASED IN SIRS AND SEPSIS

R. Vaschetto, S. Nicola, C. Olivieri, **E. Boggio**, F. Piccolella, R. Mesturini, F. Damnotti, D. Colombo, P. Navalesi, F. Della Corte, U. Dianzani and A. Chiocchetti *ICM*, 2008.

ROLE OF TIMP-1 IN DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY-LYMPHOPROLIFERATION

Elena Boggio, Manuela Indelicato, Elisabetta Orilieri, Sara Bocca, Riccardo Mesturini, Chiara Sarasso, Maria Clorinda Mazzarino, Maria Francesca Campagnoli, Ugo Ramenghi, Umberto Dianzani, and Annalisa Chiocchetti *JACI*, 2009, *submitted*