

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



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXV***

Relazione 1° anno

**RUOLO DI OSTEOPONTINA NELLA SCLEROSI
MULTIPLA**

Candidato: Angela Maria Felicia Soluri

***Responsabili del progetto:* Prof. Umberto Dianzani
Dott.ssa Annalisa Chiocchetti**

INTRODUZIONE

Aspetti generali dell'autoimmunità.

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*).

La tolleranza al *self* inizia durante lo sviluppo linfocitario quando i precursori dei linfociti B e T subiscono, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo, un rigoroso processo di selezione clonale con cui si eliminano non solo i linfociti che non riescono a riarrangiare in modo produttivo i geni dei recettori per l'antigene (*selezione positiva*) ma anche quelli che riarrangiano un recettore autoreattivo (*selezione negativa*). Negli anni '60 si riteneva che la selezione negativa eliminasse tutti i linfociti autoreattivi e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori in questo processo di delezione. In realtà i meccanismi di tolleranza centrale non sono sufficienti per eliminare tutti i linfociti potenzialmente autoreattivi dal momento che non tutti gli antigeni autologhi sono rappresentati a livello degli organi linfoidi centrali. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali del fatto che linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali. Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia, come l'anergia e la delezione periferica.

Inoltre, a livello periferico, cellule debolmente autoreattive possono essere regolate negativamente attraverso l'azione di citochine Th2 non infiammatorie prodotte da linfociti T differenziati (*immunomodulazione*) oppure attraverso l'azione di linfociti T regolatori capaci di esercitare una immunosoppressione dominante nei confronti dei linfociti autoreattivi.

Un meccanismo di controllo dell'autoimmunità è, inoltre, rappresentato dalla naturale tendenza delle risposte immunitarie ad auto-limitarsi. 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.

I sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno chiamato autoimmunità.

I fattori che possono determinare il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono molteplici, ed includono 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, negli agenti infettivi, di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del “mimetismo molecolare”), può determinare una “cross-reazione” contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest’ultimo è stato eliminato. Inoltre l’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati visti dal sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*. Infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall’infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e l’attivazione delle APC aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente ipereattivo potrà permettere l’attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

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

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

Le malattie autoimmuni colpiscono il 5-10% della popolazione dei paesi occidentali. Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-

specifiche e quelle sistemiche. Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria, caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi o linfociti-T-effettori, è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso, come per esempio nel diabete mellito di tipo 1, nella sclerosi multipla (SM) e nella tiroidite di Hashimoto. Nelle malattie autoimmuni sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi ubiquitariamente e coinvolge quindi più organi e tessuti, come ad esempio nella sindrome autoimmune linfoproliferativa (il cui acronimo è APLS) e nel lupus eritematoso (LES).

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule. Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare. Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggreediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

L'autoimmunità presenta una eziologia multifattoriale in cui diversi fattori genetici associati a fattori scatenanti (età, sesso, background genetico, esposizione a fattori infettivi e ambientali) concorrono ad aumentare la suscettibilità della malattia stessa [1].

La sclerosi multipla (SM).

Epidemiologia

La SM è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC). Se si escludono i traumi, è la causa più frequentemente di disabilità neurologica nei giovani adulti. E' più frequente nel sesso femminile, e il rapporto femmine/maschi varia da 1,9 a 3,1. L'esordio è raro prima dell'adolescenza situandosi in genere fra i 20 e i 45 anni, con un picco d'incidenza per età intorno ai 30 anni.

E' diffusa in tutto il mondo, ma numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una disomogeneità nella sua distribuzione geografica.

Si possono individuare zone ad alto rischio, con tassi di prevalenza uguali o superiori a 30 casi di SM definita per 100000 abitanti, comprendenti gli USA settentrionali, il Canada meridionale, l'Europa centro-settentrionale, l'Australia sud-orientale e la Nuova Zelanda; zone a medio rischio, con tassi compresi tra 5-25/100000, comprendenti l'Europa mediterranea, gli USA meridionale la popolazione bianca del Sud Africa; ed infine, zone a basso rischio, con tassi inferiori a 5/100000 comprendenti Asia, Africa, gli stati settentrionali del Sud America e i Caraibi. In Italia la prevalenza è di 20/100.000 con un numero totale di pazienti stimato di circa 50.000, con la più alta prevalenza in Sicilia e Sardegna.

La causa della SM non è ancora stata chiarita e diversi studi suggeriscono si tratti di una malattia multifattoriale che dipende da fattori ambientali, genetici, immunologici.

Il decorso della SM presenta caratteristiche variabili ed imprevedibili. Si distinguono tre tipi fondamentali di SM in relazione al decorso della malattia:

- a) nel 85% circa dei casi la malattia si presenta e procede per "poussée". In questa forma definita a "ricadute e remissioni" (**RR**) vi sono recidive imprevedibili durante le quali appaiono nuovi sintomi oppure i sintomi già presenti diventano più severi. I sintomi neurologici, che sono la controparte clinica dei fenomeni infiammatori che portano alla rottura della barriera emato-encefalica e alla formazione di nuove lesioni, sono seguiti da una remissione completa o parziale che può durare mesi o anche anni. Dopo un periodo variabile dall'esordio, in genere 5-20 anni, nella maggior parte dei casi il decorso diventa progressivo, con o senza ricadute sovrapposte, configurando la forma "secondaria progressiva" (**SP**).
- b) **SP**: questa variante della SM viene considerata come un secondo stadio della malattia, poiché si presenta nella maggior parte dei pazienti con SM RR. Si osservano attacchi acuti isolati ma la regressione, in questo caso, non è completa e tra un attacco e l'altro l'invalidità

progredisce. Con il tempo il numero di attacchi acuti si riduce mentre il grado di invalidità aumenta progressivamente.

- c) In circa il 10% dei casi, la malattia mostra un accumulo progressivo di sintomi neurologici irreversibili definendo la forma “progressiva primaria” (**PP**), dovuta a meccanismi immunopatologici parzialmente distinti [2]. Mancano gli episodici attacchi acuti, così come le remissioni. Solo occasionalmente si assiste a piccoli miglioramenti transitori.

Accanto a queste forme ne troviamo altre due: la forma benigna e la forma progressivo-ricidivante. La prima è caratterizzata da un recupero completo dopo uno o due recidive e non causa deficit permanenti. La diagnosi di una sclerosi di tipo benigno è molto difficile e può avvenire solo dopo 10-15 anni dall'esordio dei primi sintomi; questa forma è associata a sintomi meno severi generalmente legati ad una alterazione della sensibilità; mentre la forma progressivo-ricidivante caratterizzata da un decorso progressivo fin dall'esordio, con recidive seguite o meno da recupero. Gli intervalli tra una ricaduta e l'altra sono caratterizzati da una continua progressione della malattia, a differenza di una forma ricidivante-remittente dove l'intervallo che intercorre tra due ricadute è privo di progressione.

Fattori immunologici

Un insieme di dati clinici e sperimentali supportano l'ipotesi che si tratti di una malattia a genesi autoimmune. In particolare, questa ipotesi si fonda sulle seguenti osservazioni: a) nel contesto delle lesioni demielinizzanti sono presenti cellule infiammatorie [3;4]; b) la suscettibilità alla malattia è legata a geni importanti per il controllo della risposta immunitaria [5]; c) il decorso della malattia può essere modificato da terapie immunomodulanti [6;7]; d) si riscontrano alterazioni immunitarie quali la presenza di anticorpi oligoclonali nel liquor [8]. Una delle indicazioni più attendibili in favore di questa ipotesi è costituita dalle analogie cliniche e neuropatologiche con l'encefalomielite autoimmune sperimentale (acronimo inglese, EAE) [9]. L'EAE viene indotta attivamente, immunizzando l'animale suscettibile con proteine della mielina, oppure passivamente attraverso il trasferimento adottivo di linfociti T encefalito-genici specifici per tali proteine [10;11]. E' mediata dai linfociti T CD4+ reattivi verso un epitopo dominante della proteina basica della mielina (MBP) nell'ambito del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II.

Si pensa che queste cellule appartengano alla popolazione linfocitaria Th1, caratterizzata dalla secrezione delle citochine proinfiammatorie IL2, IFN- γ , TNF- α . Infatti, si ottiene un beneficio terapeutico in molti modelli animali di EAE bloccando la via di trasduzione mediata dal TNF- α e polarizzando le cellule verso un fenotipo Th2.

Nonostante ciò, recenti studi hanno dimostrato come l'EAE e la SM non siano un esempio di univoca risposta Th-mediata ma che il meccanismo alla base sia più complesso. Infatti topi knockout per IFN- γ o per TNF- α sviluppano comunque una EAE anche se con una suscettibilità e severità diverse dai topi *wild-type* [12;13]. Inoltre, un'altra citochina a cui è stato imputato un ruolo nello sviluppo di questa malattia è IL-17. Nel 1999 infatti fu osservata la presenza di elevati livelli di tale molecola nel sangue e nel liquido cerebrospinale di pazienti SM. Recentemente sono stati pubblicati studi che dimostrano l'associazione tra lo sviluppo di placche demielinizzanti e l'accumulo di Th17 nel SNC e periferico; inoltre pazienti RR presentano elevati livelli di *retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C* (RORC), noto fattore di trascrizione associato al differenziamento in senso Th17.

Nell'uomo i risultati, ottenuti dall'analisi molecolare della risposta T contro la MBP, hanno evidenziato che numerose porzioni della proteina sono riconosciute, nell'ambito di diverse molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, da molteplici famiglie del TCR. Tali risultati, che discordano da quanto osservato nella EAE in cui la risposta immune è diretta contro un epitopo immunodominante, probabilmente sono dovuti alla profonda differenza genetica tra i roditori di laboratorio (ceppi "*inbred*") e l'uomo (specie "*outbred*").

Gli interventi sperimentali di terapia immunologica nell'uomo si sono focalizzati sul blocco dei cloni T CD4+ diretti contro le proteine della mielina, sulla polarizzazione verso un fenotipo Th2 o sul blocco della traduzione del segnale via TNF. Queste strategie molto efficienti nel classico modello EAE, non sono altrettanto valide nell'uomo ed a volte peggiorano il corso della malattia. [14;15].

Anche i meccanismi umorali dell'immunità sembrano essere coinvolti nel danno neuronale. Nei pazienti con SM sono state documentate risposte anticorpali nei confronti della MBP, della glicoproteina associata alla mielina (MAG), della proteina proteo lipidica (PLP) e dell' α -B cristallina [16]. E' corretto ricordare che, ogni iniziale risposta dei linfociti T verso un autoantigene, può scatenare successivamente una risposta più diversificata contro altri autoantigeni, un fenomeno noto come "*epitope spreading*".

L'importanza di una risposta umorale è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor in più del 90% dei casi di SM pur non rappresentando una specificità di questa malattia dal momento che si possono trovare in molte altre patologie infiammatorie del SNC come anche infettive o autoimmuni.

Patogenesi

E' universalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo chiave nella patogenesi della sclerosi multipla. Le prime evidenze indicavano i linfociti T CD4+ come mediatori chiave nella patogenesi della malattia, grazie a studi condotti sul modello animale murino (EAE) [17]. E' opinione comune che gli eventi iniziali dell'attivazione dei linfociti T avvengano in periferia dove i linfociti T incontrerebbero uno specifico autoantigene presentato da molecole del MHC-II in presenza di segnali costimolatori come B7-1 e B7-2 sulle cellule presentanti l'antigene. Queste cellule autoreattive potrebbero essere presenti a livello periferico come linfociti "quiescenti", senza manifestare il proprio potenziale autoaggressivo. Uno stimolo esterno, quale una malattia infettiva, potrebbe attivare questi linfociti.

Affinché possa iniziare una risposta immunitaria locale a livello del SNC, i linfociti T circolanti attivati in periferia devono attraversare la barriera ematoencefalica.

Il processo di diapedesi attraverso questa struttura, implica una complessa interazione tra a) molecole di adesione, b) chemochine, c) proteasi in grado di alterare la membrana basale, la matrice extracellulare e di degradare la mielina [18].

Nella fase successiva, i macrofagi e la microglia giocano un ruolo chiave. Questi elementi agiscono come APC a livello locale, perpetuando la demielinizzazione immunomediata attraverso: a) la fagocitosi, b) il rilascio di citochine, c) l'attivazione di proteasi, d) il rilascio di mediatori tossici. La reazione infiammatoria perciò aggredisce la mielina a livello del SNC producendo prima demielinizzazione e poi danno assonale, che induce un deficit neurologico irreversibile.

Dati recenti dimostrano un importante ruolo dei linfociti CD8+ [19]; esiste infatti una significativa correlazione tra la presenza dei linfociti CD8+ ed il danno assonale nelle lesioni sclerotiche [20]. Resta ancora da definire come i linfociti CD8+ contribuiscano alla patogenesi della malattia. Studi su modelli animali hanno suggerito sia un ruolo da "mediatori" sia da "soppressori" dell'infiammazione. Nel primo caso, le cellule CD8+ danneggerebbero direttamente gli assoni, a seguito del riconoscimento degli epitopi presentati su MHC-I espressi in superficie dagli assoni stessi o indirettamente, distruggendo le cellule gliali che presentano epitopi di classe I, lasciando gli assoni esposti ad un'altra forma di infiammazione. Nel secondo caso invece, il loro ruolo di "soppressori" si esplicherebbe nel diretto riconoscimento di molecole di classe I sulle cellule CD4+ [21]. Il contributo dei linfociti CD8+ al danno assonale potrebbe essere determinato dal rilascio di "mediatori" chimici.

Osteopontina (OPN).

Caratteristiche strutturali e funzionali

OPN è una glicoproteina acida fosforilata a livello di diversi residui di serina ed è implicata in eventi fisiologici e patologici tra i quali il rimodellamento osseo, l'infiammazione, il cancro, l'angiogenesi, le patologie cardiovascolari e le malattie autoimmuni [22-25]. OPN esiste come proteina immobilizzata nella matrice extra-cellulare, ma anche come citochina solubile nei fluidi biologici, dove agisce come importante componente dei processi infiammatori e della risposta immunitaria [26;27].

Fu inizialmente identificata come la più abbondante sialoproteina presente nel tessuto osseo [28], ma è stata successivamente ritrovata anche nella placenta, nel rene, nel muscolo liscio e nei leucociti.

OPN è secreta principalmente dagli osteoblasti e dagli osteociti, dalle cellule epiteliali renali, dalle cellule del muscolo liscio, dalle cellule endoteliali, ma è anche abbondantemente espressa dai linfociti T e B attivati (fu identificata come *Early T-cells Activation* - Eta-1) dai monociti-macrofagi, dalle cellule NK e dalle cellule dendritiche.

OPN è codificata da un gene polimorfico formato da 7 esoni e 6 introni e localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (4q21-q25). Il suo peso molecolare varia tra 25 e 80 kDa in base alle modificazioni post traduzionali ai quali è sottoposta, tra cui glicosilazione, fosforilazione e clivaggio ad opera della trombina. 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 MMP, in particolare della MMP-3 e della 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 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, favorendo i meccanismi di adesione di linfociti T e B, macrofagi, piastrine, osteoclasti, e cellule del muscolo liscio. È stato dimostrato che il legame di OPN con l'integrina $\alpha v\beta 3$ media la migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi [29;30].

OPN è in grado di interagire anche con diverse isoforme di CD44, in particolare con CD44_{v6-7}. CD44 è una proteina di membrana glicosilata coinvolta nell'adesione e nell'*homing* dei linfociti. Questa interazione media la funzione chemotattica di OPN, riduce l'espressione di IL-10 e IL-4, e favorisce la produzione di IL-12 [31;32]. Il legame di OPN sia con CD44 sia con le integrine polarizza i linfociti T verso una risposta Th1 [33].

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 [34;35]. Recentemente è stata identificata una forma intra-cellulare di OPN (iOPN) la quale viene generata a partire da un sito di trascrizione alternativo non-AUG, a valle di quello canonico, che determina la perdita del peptide segnale [36]. Il ruolo principale attribuito a iOPN è quello di inibire la produzione di IL-27, potente inibitore della produzione di IL-17, da parte delle cellule dendritiche, favorendo quindi lo sviluppo di un fenotipo Th17 [37].

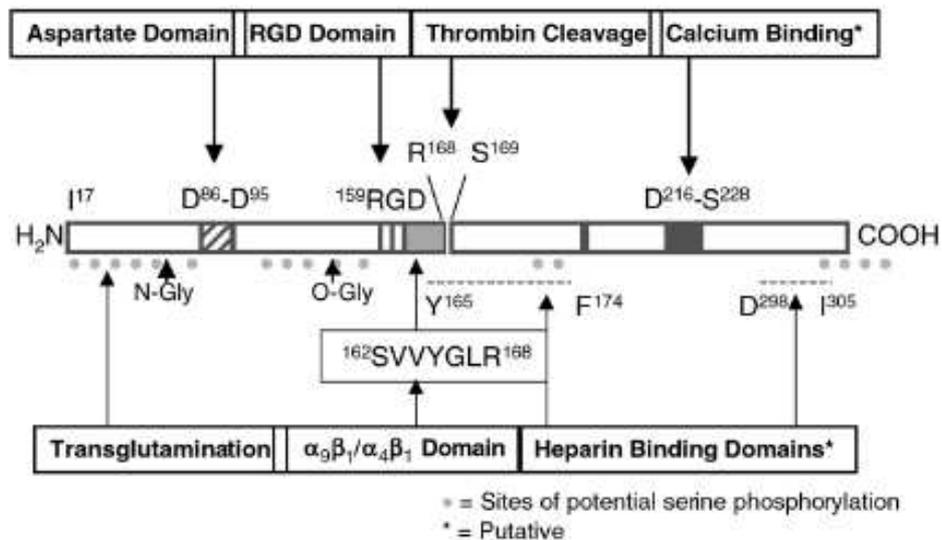


Figura 1. Rappresentazione schematica di OPN.

Ruolo nell'infiammazione

Sebbene identificata nel 1985, il coinvolgimento di OPN 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 *Protein Kinase C* (PKC) [38].

OPN è una molecola con un duplice ruolo, pro- ed anti-infiammatorio. Per ciò 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* [39]. 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 il richiamo locale di macrofagi [40]; mentre il legame con il recettore CD44, a livello dell'estremità C-terminale, promuove la chemotassi e l'attivazione dei macrofagi stessi [41].

OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli *in vivo* ed è espressa dagli istiociti nei granulomi di varia natura come nella tubercolosi e nella sarcoidosi. 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 [42;43].

OPN influenza anche la differenziazione dei linfociti T, favorendo la produzione di IFN- γ e l'espressione di CD40L [44]. Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione *Forkhead Box O3A*, (Foxo3a) e NF- κ B [45;46].

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 attraverso l'inibizione di iNOS [47;48]. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che OPN ha un effetto anti-infiammatorio durante la seconda esposizione all'antigene in corso di episodi allergici [49].

Ruolo nei tumori

OPN svolge un ruolo fondamentale anche nello sviluppo dei tumori esercitando i suoi effetti prometastatici 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 proteina chinasi Rac. Diversi studi hanno dimostrato che OPN protegge le cellule tumorali dall'apoptosi attivando la via di sopravvivenza di fosfatidilinositolo3chinasi(PI3K)-Akt [50].

OPN è iper-espressa in diversi tipi di tumore tra i quali tumore della mammella, della prostata, osteosarcomi, glioblastomi e melanomi [51]. 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 della *RNA interference*, ha dimostrato una soppressione dello sviluppo dell'adenocarcinoma al colon sia *in vitro* che *in vivo* [42].

Ruolo nelle malattie autoimmuni

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 Th1. Lo studio svolto su topi transgenici per OPN (OPN^{+/+}), overesprimenti la citochina, ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associati alla produzione di autoanticorpi e iper-gammaglobulinemia [53].

Elevati livelli di OPN sono stati rilevati nelle lesioni cerebrali di pazienti affetti da SM. Inoltre, il topo *knock-out* per OPN sviluppa una forma più lieve di EAE, modello sperimentale della SM, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type* [54]. OPN è una citochina chiave nell'EAE in quanto ligando delle integrine αV regola l'attività degli oligodendrociti, principali responsabili del processo di rimielizzazione e favorisce la formazione della mielina [55].

Nell'artrite reumatoide (AR) l'espressione di OPN è elevata nei fibroblasti, nei macrofagi e nei liquidi sinoviali, dove inibisce la produzione di ossido nitrico e di prostaglandina E_2 . Il topo *knock-out* per OPN mostra protezione dalla AR, confermando il ruolo di OPN nella patogenesi della malattia [56].

Inoltre, un possibile ruolo di OPN nello sviluppo di malattie autoimmuni, potrebbe essere spiegato dal fatto che OPN è in grado di favorire lo sviluppo di un fenotipo Th17, coinvolto nella patogenesi della SM, del LES e dell'AR [57-59]. Dati recenti di letteratura hanno dimostrato come OPN sia in grado di favorire la produzione di IL-17, inibendo l'espressione di IL-27, noto inibitore di IL-17 [60].

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo dell'autoimmunità nell'uomo sono molteplici [61] e lo studio dei polimorfismi di OPN ha portato ad interessanti associazioni con alcune malattie autoimmuni.

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 degli aplotipi B e/o C presentano un rischio 8 volte maggiore di sviluppare ALPS, rispetto agli individui omozigoti AA. Nel caso della SM e del LES i portatori dei genotipi B e/o C presentano un rischio di sviluppare la malattia di 1.5 volte maggiore, rispetto ai portatori del genotipo AA [62;63]. L'incremento dei livelli di OPN è perciò da correlare alla frequenza del genotipo non-AA, associato ad un aumento dell'espressione basale di tale citochina. Inoltre il nostro laboratorio ha dimostrato che i diversi aplotipi di OPN correlano con la progressione e la severità della SM; come misura della progressione vengono correlati pazienti che evolvono dalla forma RR alla SP entro i dieci anni dall'esordio della malattia (progressione rapida) e quelli che permangono nella forma RR oltre i 10 anni (progressione lenta); la percentuale dei soggetti che presentano una progressione lenta della malattia si è mostrata significativamente più elevata nei pazienti portatori del genotipo AA, rispetto ai non-AA (85% vs 62%, $p=0.022$) [62].

Il genotipo AA risulta quindi essere protettivo nei confronti sia dello sviluppo dell'ALPS che nell'SM.

Ruolo nella sclerosi multipla.

L'associazione di OPN con la sclerosi multipla è stata studiata estensivamente. OPN è stata identificata come la citochina più abbondante presenti nelle lesioni SM. I livelli di trascritto di OPN nelle placche delle lesioni cerebrali di pazienti con SM risultano superiori di 5 volte rispetto ai controlli[64]. Significativamente elevati livelli della proteina si ritrovano nel plasma di pazienti che presentano la forma RR della malattia mentre i livelli plasmatici di OPN nei pazienti con la forma PP e SP sono simili a quelli dei controlli sani [65].

Nel modello murino di EAE la somministrazione di rOPN a topi OPN^{-/-} induce ricadute ricorrenti e un peggioramento della paralisi e dei deficits neurologici. Inoltre topi OPN-deficienti mostrano, rispetto ai topi wild type, un decorso della malattia significativamente più lieve, una maggiore velocità di ripresa, assenza di ricadute spontanee e una minore progressione nella forma SP [64;66]. Steinman L. e coll [13] hanno dimostrato che il legame di OPN all'integrina $\alpha 4\beta 1$ previene la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione *forkhead box O3A* (FOXO3A) bloccando la trascrizione di geni pro-apoptotici come BIM, BAK e BAX; inoltre OPN aumenta la degradazione di I κ B- α con conseguente attivazione e traslocazione nucleare del fattore trascrizionale NF- κ B che up-regola l'espressione di geni anti-apoptotici e di citochine di tipo Th1 e Th17. La somma degli effetti di OPN sui fattori trascrizionale FOXO3A e NF- κ B porta, pertanto, alla sopravvivenza dei linfociti T autoreattivi. Questi risultati suggeriscono che OPN possa modulare l'eliminazione per apoptosi di linfociti infiltrati e di cellule infiammatorie nelle lesioni cerebrali di SM.

OPN potrebbe avere un ruolo nel reclutamento dei linfociti autoreattivi verso i tessuti cerebrali infiammati attraverso la membrana ematoencefalica. Infatti OPN è un membro delle Sibling (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) proteins [62] ed è secreta ad elevati livelli nella matrice extracellulare perivascolare durante l'induzione dell'EAE. In **figura 2** è mostrato il ruolo patogenetico di OPN nella sclerosi multipla. I linfociti T esprimono l'integrina $\alpha 4\beta 1$ (anche nota come VLA4), che permette loro di legare VCAM1 (vascular cell adhesion molecole 1) e osteopontina espresse dalle cellule endoteliali che circondano le venule. I linfociti T possono quindi andare incontro a diapedesi e attraversare la matrice extracellulare per entrare, infine, nel Sistema Nervoso Centrale. Qui la secrezione di citochine, OPN e altre molecole da parte dei linfociti T e della APC danneggia gli oligodendrociti che producono la mielina. Inoltre plasmacellule autoreattive possono produrre anticorpi mielina-specifici che danneggiano ulteriormente la guaina mielinica.

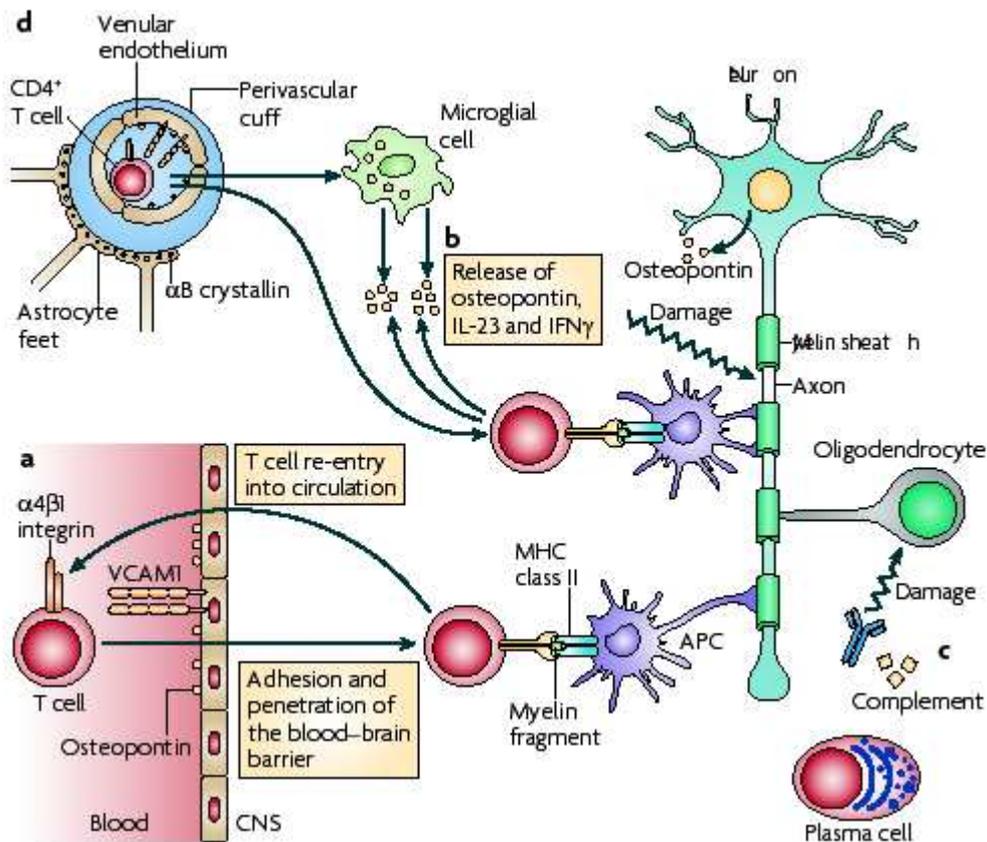


Figura 2 Ruolo di OPN nella patogenesi della sclerosi multipla

Anticorpi diretti contro le catene $\alpha 4$ o $\beta 1$ possono bloccare il legame dei linfociti T umani all'endotelio cerebrale infiammato e inibire l'insorgenza dell'EAE [63;67]. Queste evidenze sperimentali hanno portato allo sviluppo di un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'integrina $\alpha 4\beta 1$ (Natalizumab), attualmente in fase III della sperimentazione clinica. La somministrazione mensile del Natalizumab per un periodo di almeno due anni ha mostrato riduzione della frequenza delle recidive e delle lesioni nei due terzi dei pazienti trattati [68;69]. OPN è in grado di legare l'integrina $\alpha 4\beta 1$ solo dopo aver subito un taglio proteolitico ad opera della Trombina, che permette la formazione di due porzioni N- e C-terminale di uguale peso molecolare. Il frammento N-terminale si caratterizza per l'esposizione di due siti critici di legame per l'integrina $\alpha 4\beta 1$.

SCOPO DEL LAVORO

Osteopontina (OPN) è una fosfoproteina di circa 60kDa che agisce sia come citochina nei fluidi corporei sia come componente della matrice extracellulare; è espressa ad alti livelli nelle placche demielinizzanti dei pazienti con Sclerosi Multipla (SM) e dei topi con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello murino di SM. I topi privi di OPN sviluppano un quadro EAE meno severo rispetto ai topi normali e la somministrazione di rOPN a tali topi induce una ricaduta immediata con successiva evoluzione verso la forma progressiva e la morte. Ciò suggerisce un ruolo importante di OPN nella genesi della SM e nella sua evoluzione.

OPN è prodotta ad alti livelli nella matrice extracellulare della barriera ematoencefalica: in questa sede potrebbe giocare un ruolo nel reclutamento dei linfociti attraverso la barriera ematoencefalica, processo garantito dalla integrina $\alpha4\beta1$. Tale recettore è il bersaglio del farmaco Natalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato il cui utilizzo ha mostrato una riduzione dei sintomi e delle lesioni cerebrali nei due terzi dei pazienti trattati.

OPN è in grado di legare $\alpha4\beta1$ solo dopo aver subito un taglio proteolitico ad opera della Trombina, la quale determina lo smascheramento di due siti critici di legame a tale integrina, nella porzione N-terminale. Tale taglio proteolitico, infatti, permette la formazione di due porzioni: l'N-terminale che contiene due siti di legame per $\alpha4\beta1$ e la C-terminale che contiene un sito di legame per un'altra proteina, CD44, coinvolta nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria. Il legame di OPN all' $\alpha4\beta1$ è interessante poiché questa integrina è espressa dai linfociti T e gioca un ruolo cruciale nel loro starvaso nel SNC. Infatti anticorpi diretti contro le catene $\alpha4$ o $\beta1$ sono in grado di bloccare il legame dei linfociti T all'endotelio cerebrale infiammato e di inibire lo sviluppo dell'EAE[67]. Poiché OPN è altamente espressa nelle placche di SM/EAE a livello della matrice extracellulare perivascolare è stato suggerito che essa potrebbe giocare un ruolo nel reclutamento dei linfociti T autoreattivi agendo in sinergia con VCAM-1, attraverso il legame con $\alpha4\beta1$. Teoricamente questa funzione di OPN sarebbe attribuibile al frammento N-terminale generato dal taglio proteolitico della trombina, poiché nella proteina full-length i siti di legame all'integrina $\alpha4\beta1$ sono mascherati. Ad oggi, tuttavia, questa possibilità non è stata investigata *in vivo*.

Questo lavoro si propone lo scopo di valutare il ruolo patogenetico di OPN nella SM e nell'EAE attraverso lo studio funzionale dei due frammenti generati dalla Trombina. A tal fine sono state prodotte proteine ricombinanti di OPN sia umane che di topo: la proteina wild type, le porzioni N- e C-terminale e la proteina intera ma mancante del sito di taglio della Trombina. Le proteine di topo saranno utilizzate *in vivo* per studiarne il ruolo nell'EAE. Quelle umane invece verranno utilizzate per valutarne l'effetto sui linfociti, sui monociti e sui macrofagi *in vitro*. Questo può fornire informazioni utili per la produzione di nuovi farmaci e garantire approcci terapeutici diversi.

MATERIALI E METODI

LINEE CELLULARI

HeLa, sono cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate derivanti da un cancro della cervice uterina. Crescono in adesione in terreno DMEM 10% FBS.

CLONAGGIO DEI MUTANTI DI OPN UMANA E MURINA

I costrutti mutanti umani e murini di OPN fusi al Fc delle Ig sono stati generati inserendo il cDNA corrispondente, privato della sequenza leader, nei vettori pHYGRO-Human e pHYGRO-Mouse, rispettivamente contenenti le sequenze CH2-CH3 delle IgG e il tag SV5.

I primers utilizzati sono i seguenti:

human OPN full-length

Primer forward: BssHII OPN

5' ttgGCGCGCATGCCATACCAGTTAAACAGGCTGATTC 3'

Primer reverse: NheI OPN

5' ctaGCTAGCATTGACCTCAGAAGATGCACTATC 3'

human OPN N-ter

Primer forward: BssHII OPN

Primer reverse: OPN (aa1-168) NheI

5' ctaGCTAGCCCTCAGTCCATAAACCACAC 3'

human OPN C-ter

Primer forward: OPN (aa 169-314) BssHII

5' ttgGCGCGCATGCCTCAAAATCTAAGAAGTTTCGCAG 3'

Primer reverse: NheI OPN

mouse OPN full-length

Primer forward: BssHII MsOPN

5' ttgGCGCGCATGCCCTCCCGGTGAAAGTGACTG 3'

Primer reverse: NheI MsOPN

5' ctaGCTAGCGTTGACCTCAGAAGATGAACTC 3'

mouse OPN N-ter

Primer forward: BssHII MsOPN

Primer reverse: MsOPN (aa17-153) NheI

5' ctaGCTAGCCCTCAGTCCATAAGCCAAGC 3'

mouse OPN C-ter

Primer forward: MsOPN (aa 154-294) BssHII

5' ttgGCGCGCATGCCTCAAAGTCTAGGAGTTTCCAGG 3'

Primer reverse: NheI MsOPN

Per produrre i costrutti mutati nel sito di taglio della trombina è stato necessario scomporre il cDNA di OPN in due pezzi, sfruttando la presenza di un sito unico di restrizione in prossimità degli aa da mutare. Sono stati disegnati due primers con orientamento forward specifici (uno per la molecola umana e uno per quella murina) mutati nelle triplette codificanti per gli aa desiderati. Tali primers sono stati utilizzati in una reazione di PCR con i primers revers che appaiano al 3' di OPN. Il pezzetto wild-type mancante è stato ottenuto per restrizione enzimatica. In particolare i primers utilizzati sono:

human OPN mut

Primer forward OPN mut Nde For

5' GGAATTCCCATATGATGGCCGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGACTGAGCTTTAAATC
TAAGAAGTTTCGC 3'

Primer reverse: NheI OPN

mouse OPN mut

Primer forward MsOPN mut EagI For

5' CCAACCGGCCGAGGTGATAGCTTGGCTTATGGACTGAGCTTTAAGTCTAGGAGTTTC
CAG 3'

Primer reverse: NheI MsOPN

Il clonaggio delle molecole mutanti nel vettore pUCOE è stato eseguito utilizzando, per tutti, la stessa coppia di primers. Il primer forward appaia sulla sequenza kozak, mentre il primer con orientamento revers appaia sul tag SV5 dei vettori pHYGRO. Essi sono:

Primer forward: BsiI sense

5' acgtCGTACGTGCCACCATGGGCTGGAGC 3'

Primer reverse: AscI anti-sense

5' acgtGGCGCGCCTTAAGTACTATCCAGGCCAG 3'

Ciascun amplificato è stato purificato con Exo-SAP-IT (GE Healthcare) e sequenziato per escludere la presenza di mutazioni mediante ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

1-3 µg di DNA plasmidico (pcDNA3.1 Hygro-FcHuman, Invitrogen, San Diego, CA) e di cDNA codificante per OPN sono stati digeriti per 2 ore a 37°C, in presenza degli enzimi di restrizione alla

concentrazione di 1-2 U di enzima / μg DNA, di tampone specifico 10x fornito dalla casa produttrice ed acqua sterile.

I frammenti di DNA (inserti) ed il vettore, opportunamente digeriti con gli enzimi di restrizione e purificati, sono stati sottoposti alla reazione di ligazione usando l'enzima T4 DNA ligasi (Invitrogen). La miscela di reazione è composta dal DNA che si vuole clonare (inserto) e dal vettore con un eccesso del primo rispetto al secondo (in rapporto 3:1), la ligasi (1-2 U di T4 DNA), il tampone 5X (fornito dalla casa produttrice dell'enzima) ed acqua sterile.

La reazione è stata condotta a 22°C per 2 ore. Per ciascuna delle reazioni enzimatiche realizzate era previsto un controllo di re-ligazione del vettore su se stesso, effettuata in assenza di inserto.

TRASFORMAZIONE BATTERICA ED ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

I prodotti della ligazione sono stati trasformati in batteri competenti del ceppo E. Coli JM109 (Promega Corporation, Madison, USA). I batteri sono stati incubati insieme al DNA per 20' in ghiaccio, per permettere l'adesione del DNA alla capsula batterica. L'ingresso del vettore nella cellula batterica è stato indotto mediante shock termico tenendo la miscela di batteri e DNA a 42°C per 45 secondi, e successivamente in ghiaccio per 2'. I batteri sono stati quindi incubati per 30' in LB Broth a 37°C, e successivamente seminati su terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

Per la preparazione dei plasmidi è stato utilizzato il kit di estrazione QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN) che si basa sulla lisi alcalina delle cellule batteriche, cresciute in terreno selettivo contenente ampicillina a 37°C in agitazione per 12-16 ore, seguita dall'adsorbimento del DNA su di una resina a scambio ionico in presenza di appropriate condizioni di pH e di forza ionica. Le proteine e le impurità vengono rimosse tramite lavaggio ed il DNA plasmidico purificato viene eluito mediante variazione di pH. Il DNA viene quindi concentrato e desalificato tramite precipitazione in isopropanolo e successivamente recuperato in tampone acquoso e quantizzato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260nm-280nm.

PROVA DI TOSSICITA'

Cellule HeLa sono state piastrate in piastra multi well da 48 pozzetti alla concentrazione di 5×10^4 in 200 μl di terreno DMEM 10%FBS. Il giorno successivo è stato cambiato il terreno a cui sono state aggiunte dosi crescenti di igromicinaB. Le cellule sono poi state incubate per 24-48-72 ore.

La concentrazione di igromicina necessaria per avere il 50% di mortalità a 48 ore di incubazione è stata fissata a 0,5mg/ml. Tale concentrazione è stata poi utilizzata per ottenere cloni trasfettati stabilmente.

TRASFEZIONE IN CELLULE HeLa

Cellule HeLa sono state coltivate in adesione su capsule Petri in terreno DMEM (Gibco, New York, Usa) addizionato di 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomicina, Gentamicina), 10% FBS (Fetal Bovine Serum) e incubate a 37°C in atmosfera umidificata, al 5% di CO₂. Il giorno prima della trasfezione le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 4x10⁶.

Le cellule sono state trasfettate utilizzando il detergente ionico commerciale, Lipofectamina 2000 (Invitrogen, San Diego, CA), secondo le istruzioni della casa produttrice. Dopo 4h dalla trasfezione il terreno è stato sostituito con DMEM privo di FBS.

WESTERN BLOTTING

Surnatanti di colture cellulari di HeLa, coltivate in assenza di FBS, sono stati raccolti dopo 48h dalla trasfezione. Le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 10% Glicerolo, 0.5mM DTT) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, Phenylmethanesulfonyl fluoride).

I campioni ottenuti sono stati caricati su gel SDS-PAGE all'8% di acrilamide secondo protocollo standard (*Current Protocols in Molecular Biology*); i surnatanti sono stati caricati puri, mentre i lisati proteici sono stati dosati mediante l'uso di Protein Assay (Bio-Rad Hercules, CA, USA), una variante del metodo Braedford e successivamente caricati alla quantità di 1 e 2 µg.

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, GE Healthcare, Piscataway, NY, USA) per 1,5h a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma Aldrich) e poi lavata con TBS (Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l pH 7,6) 1% Tween-20. La nitrocellulosa è stata saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e quindi incubata 16 ore a 4°C con i seguenti anticorpi: mAb α-FcHuman (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mAb α-SV5 (Sigma-Aldrich) e mAb α-OPN (Upstate, New York, Usa). Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato 1h con anticorpo secondario coniugato ad HRP. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro è stato incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione è stato utilizzato per impressionare i film da autoradiografia. Il segnale ottenuto sulle lastre impressionate rappresenta quindi le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo primario specifico.

PURIFICAZIONE PROTEICA

Il mezzo di coltura contenente la proteina chimerica rhOPN-FcH è stato raccolto e sottoposto a cromatografia per affinità su protein A-Sepharose (GE Healthcare). La proteina è stata eluita mediante Glicina 0,1M pH2,7, neutralizzata con 20% vol/vol di Tris Base 2M e dializzata contro PBS 1X.

DOSAGGIO DELLA PROTEINA rhOPN-FcH

La concentrazione di OPN ricombinante presente nel surnatante di cellule HeLa trasfettate con il plasmide pUCOE + rhOPN-FcHuman, è stata determinata impiegando il kit ELISA hOPN (R&D system) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

L'OD dei campioni è stata rilevata tramite lettore ottico Spectra Count con filtro a 450 nm (Bio-Rad). Infine, è stato utilizzato il programma I-smart per l'analisi dei dati e la costruzione della curva di regressione.

SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO (PBMCs)

Per la separazione dei PBMC, 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 1X, stratificato su Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cederlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada) e centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti.

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS.

DOSAGGIO DELLA SECREZIONE CITOCHINICA DI INF- γ DA PARTE DI PBMCs ATTIVATI IN PRESENZA DI rhOPN-FcH

I PBMC sono stati piastrati alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto in 100 μ l e per indurre l'attivazione sono stati coltivati in presenza di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (clone OKT3) (1 μ g/mL), precedentemente adeso alla piastra di coltura mediante incubazione ON a 4°C.

Le cellule sono state stimolate o meno con 1 μ g/ml di rhOPN (R&D system) o rhOPN-FcH. I surnatanti ottenuti sono stati raccolti dopo 24h di coltura. La secrezione citochinica è stata valutata mediante il kit ELISA Human IFN-gamma Cytokine (BioLegend, San Diego, CA,USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

SAGGIO DI MORTE CELLULARE

L'AICD (*Activation Induced Cell Death*) è stata valutata su linfociti T purificati da PBMCs e attivati con 1 µg/ml PHA (Sigma-Aldrich) al giorno 0. Le cellule sono state coltivate per 6 giorni in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, 1% Penicillina, Streptamicina, Gentamicina, 10% FBS in presenza di 2U/ml di Interleuchina (IL)-2 (Sigma-Aldrich). Al sesto giorno di coltura 5×10^4 linfociti T sono stati seminati in presenza di 10 µg/ml di anti-CD3, in terreno RPMI 1640 + 5% FBS + 1U/ml IL-2 in presenza o assenza di 1 µg/ml di rhOPN (R&D system) o rhOPN-FcH e coltivati per 18 ore. Le cellule vive sono state contate sfruttando la loro incapacità di incorporare il colorante Blue di Tripano. Il 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 delle cellule vive in ogni rispettivo pozzetto di controllo) X 100.

RISULTATI

CLONAGGIO DELLA PROTEINA CHIMERICA rhOPN-FcH

La produzione della proteina ricombinante rhOPN-FcH ha previsto l'effettuazione di due clonaggi successivi. Il primo clonaggio, effettuato utilizzando primers specifici per il cDNA di OPN mancante della sequenza leader, ha permesso di ottenere la sequenza di OPN fusa alla sequenza codificante per il Fc delle IgG1 umane e al tag SV5. Questo clonaggio è stato effettuato utilizzando il vettore hpHYGRO: un vettore ingegnerizzato che presenta, a monte del sito di inserzione, la sequenza kozak e la sequenza leader delle Ig. La prima consente di aumentare la traduzione del mRNA transgenico, la seconda consente di ottenere la proteina ricombinante direttamente nel terreno di coltura delle cellule. Allo scopo di massimizzare l'efficienza della produzione della proteina chimerica il cDNA di fusione codificante per rhOPN-FcH è stato successivamente clonato nel vettore pUCOE. Questo clonaggio è stato effettuato utilizzando due primers che appaiano sul vettore pHYGRO, come schematizzato in **figura 3**. L'utilizzo del vettore pUCOE fa sì che il cDNA chimerico sia più facilmente integrato ed aumenta notevolmente i livelli di proteina ricombinante.

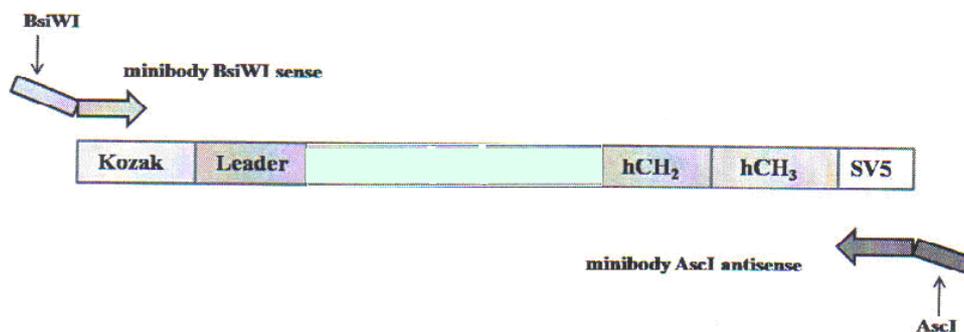


Figura 3. Rappresentazione della proteina di fusione d'interesse con indicato dove si appaiano i *primers* utilizzati per il clonaggio nel vettore pUCOE.

PRODUZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE rhOPN-FcH

Cellule HeLa coltivate fino a un valore di confluenza dell' 80% sono state trasfettate mediante lipofectamina con il plasmide pUCOE-OPNa-FcHuman-SV5

Il surnatante di coltura e i lisati cellulari sono stati caricati su di un gel di poliacrilammide al fine di verificare la effettiva produzione della proteina ricombinante e la sua presenza nel terreno di coltura cellulare. Dopo trasferimento su membrane di nitrocellulosa, queste sono state incubate con tre anticorpi primari diretti verso porzioni differenti della proteina ricombinante: Ab α -OPN, Ab α -FcHuman ed mAb α -SV5. Come si può vedere i tre anticorpi utilizzati riconoscono una banda alla stessa altezza (circa 130 kDa) nel surnatante, mentre, come atteso, la proteina non si ritrova nei lisati cellulari. (**figura 4**).

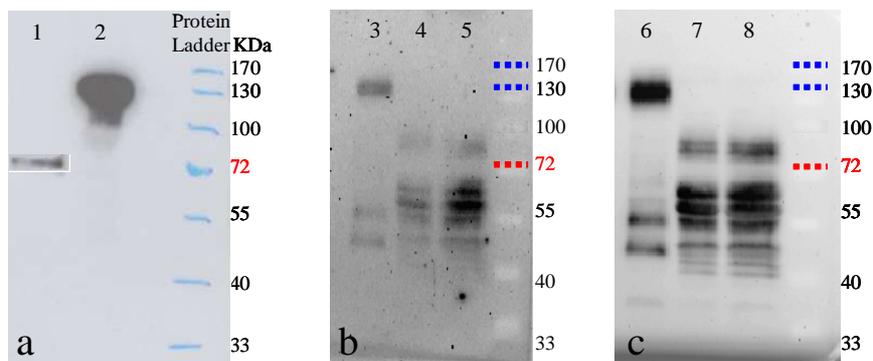


Figura 4. Analisi dell'espressione di rhOPN-FcH. a) campione 1: 100ng rhOPN R&D; 2: 400ng rhOPNa-FcH. Il filtro è stato analizzato mediante anticorpo anti-OPN **b)** 3: surnatante (SN) raccolto a 48h dalla trasfezione; 4 e 5: lisati cellulari, rispettivamente 100 e 200 μ g. È stato usato un anticorpo diretto contro il Fc delle IgG coniugato ad HRP e **c)** 6 : SN 48h; 7 e 8: 100, 200 μ g di lisati. L'anticorpo utilizzato è diretto contro il tag SV5.

Al fine di verificare la corretta struttura conformazionale di OPN nella proteina chimerica il surnatante di coltura di cellule HeLa trasfettate è stato inoltre analizzato mediante test ELISA specifico per OPN. Come si può vedere in **figura 5** la proteina ricombinante è riconosciuta dagli anticorpi presenti nel kit e ciò indica una corretta struttura tridimensionale della porzione di OPN nella proteina chimerica da noi prodotta. Il solo terreno di coltura dà invece un segnale basale dovuto a componenti che sono riconosciuti in maniera aspecifica.

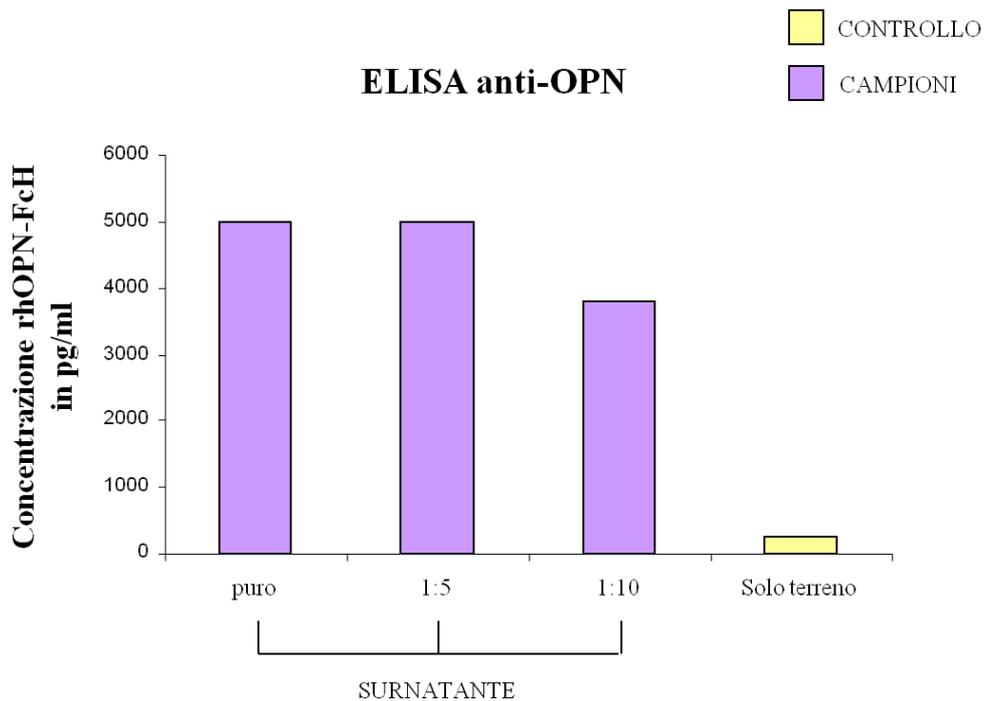


Figura 5. ELISA anti OPN del surnatante di coltura contenente la proteina rhOPN-FcH. È stato testato il surnatante di coltura di cellule HeLa trasfettate con il plasmide codificante la proteina ricombinante d'interesse. I campioni puro e diluito 1:5 superano il limite di detectabilità dato dalla curva dello standard, 4000 pg/ml; quello invece diluito 1:10 può essere quantizzato 3.6 ng/ml. La densità ottica misurata è sensibilmente più elevata di quella data dal solo terreno

PRODUZIONE DI CLONI STABILI DI CELLULE HeLa

Cellule HeLa trasfettate con il plasmide pUCOE-OPNa-FcHuman-SV5 sono state messe in selezione con igromicinaB alla concentrazione di 500µg/ml per ottenere cloni trasfettati stabilmente. La quantità di antibiotico utilizzata per la selezione è stata fissata mediante un test di tossicità effettuato sulle stesse cellule non trasfettate, ed equivale alla concentrazione capace di determinare la morte del 50% delle cellule dopo 48h di coltura.

Dopo circa una settimana di incubazione nella piastra sono rimasti visibili foci cellulari. I cloni sono stati prelevati e posti in piastra da 96 pozzetti per essere espansi, sempre in terreno selettivo. La presenza della proteina nel surnatante di coltura è stata verificata mediante ELISA anti-OPN. Al fine di valutare se l'assenza di siero nel terreno di coltura inficiasse la produzione della proteina ricombinante si è inoltre valutato la produzione della proteina da parte dei singoli cloni in presenza e in assenza di FBS.

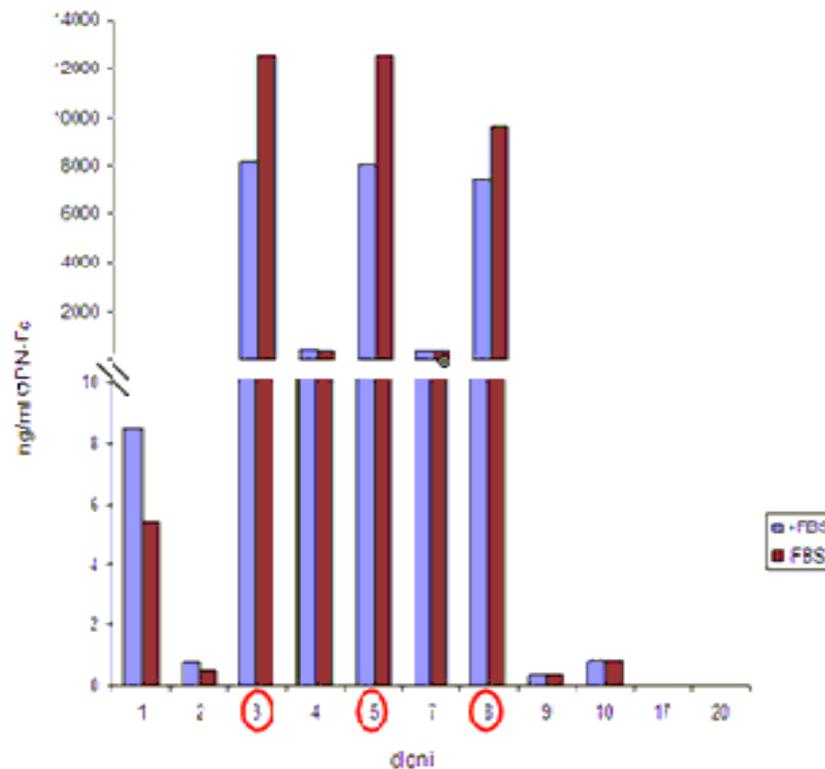


Figura 6. Analisi mediante ELISA anti OPN dei surnatante di cloni di cellule HeLa trasfettate stabilmente con il plasmide pUCOE-rhOPN-FcH

Come si può vedere i cloni n.3, 5 e 8 hanno mostrato la maggiore produzione di proteina e sono quindi stati scelti per la raccolta del surnatante e la successiva purificazione proteica. Inoltre la riduzione di proteina in assenza di siero non è da ritenersi rilevante.

PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE E QUANTIZZAZIONE DEL CAMPIONE OTTENUTO

Dati i risultati positivi circa l'espressione e la produzione di rhOPN-FcH nei cloni di HeLa, si è proceduto alla purificazione del surnatante di coltura cellulare al fine di concentrare la proteina ricombinante e di eliminare i componenti di terreno indesiderati. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia per affinità su colonna di proteina A sfruttando la capacità di tale proteina batterica di legare il Fc delle Ig umane. L'eluato dalla colonna è stato sottoposto a dialisi ON contro PBS al fine di ristabilire la giusta concentrazione salina nel campione. Le diverse fasi della purificazione sono state valutate su gel di Coomassie. La proteina è stata quantizzata al NanoDrop, e la sua effettiva concentrazione è stata valutata confrontando l'intensità della banda presente su gel di Coomassie con una curva di BSA a concentrazione nota (**figura 7**).

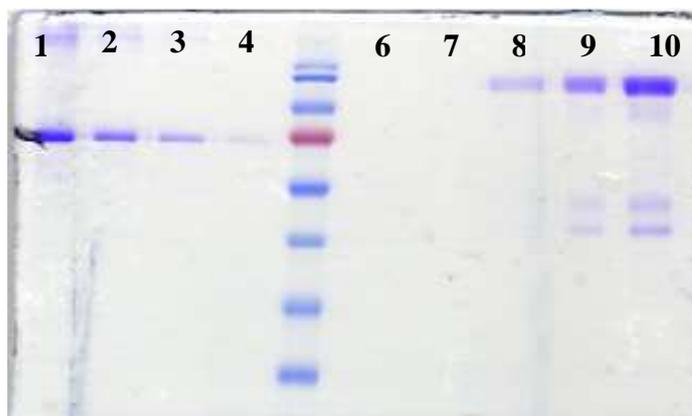


Figura 7. COOMASSIE (gel di poliacrilammide colorato con *Coomassie Brilliant Blue*). Con i numeri **1, 2, 3, 4** vengono indicate le lanes relative alla curva proteica di BSA, rispettivamente da sinistra a destra 2-1-0.5-0.25 µg , necessaria per la quantizzazione del campione. **5** flow through (surnatante contenente ciò che non si lega alla resina); **6** e **7** 1° e 2° lavaggio; **8, e 9** rispettivamente 1 e 2 µg di rhOPN-FcH purificata e dializzata

La **figura 7** mostra il Coomassie relativo alla purificazione. Il flow through ed il 1° lavaggio non contengono la proteina, mentre ne compaiono tracce nel 2° lavaggio. La quantizzazione della proteina purificata e dializzata effettuata mediante lo strumento Nanodrop è confermata dal confronto della banda data dalla proteina con la curva di BSA ed è di circa 400 µg/ml.

VALIDAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLA PROTEINA rhOPN-FcH

A questo punto, ottenuta la proteina purificata, è stato necessario verificare se effettivamente tale molecola presentasse la stessa attività funzionale della rhOPN commerciale (R&D), comunemente utilizzata nel nostro laboratorio per saggi *in vitro*.

rhOPN-FcH induce la secrezione di IFN-gamma da parte di PBMC attivati

La funzionalità della proteina ricombinante rhOPN-FcH è stata testata mediante la valutazione della secrezione di IFN- γ da parte di PBMC attivati con anticorpo anti-CD3. Gli effetti della proteina ricombinante da noi prodotta sono stati confrontati con quelli indotti dalla proteina rhOPN commerciale (R&D). In **figura 8** sono mostrati i livelli di secrezione di IFN- γ valutati mediante ELISA sui surnatanti raccolti dopo 24h di coltura. I livelli di secrezione di IFN- γ da parte di PBMCs in presenza di rhOPN-FcH risultano del tutto sovrapponibili a quelli indotti in presenza della proteina commerciale.

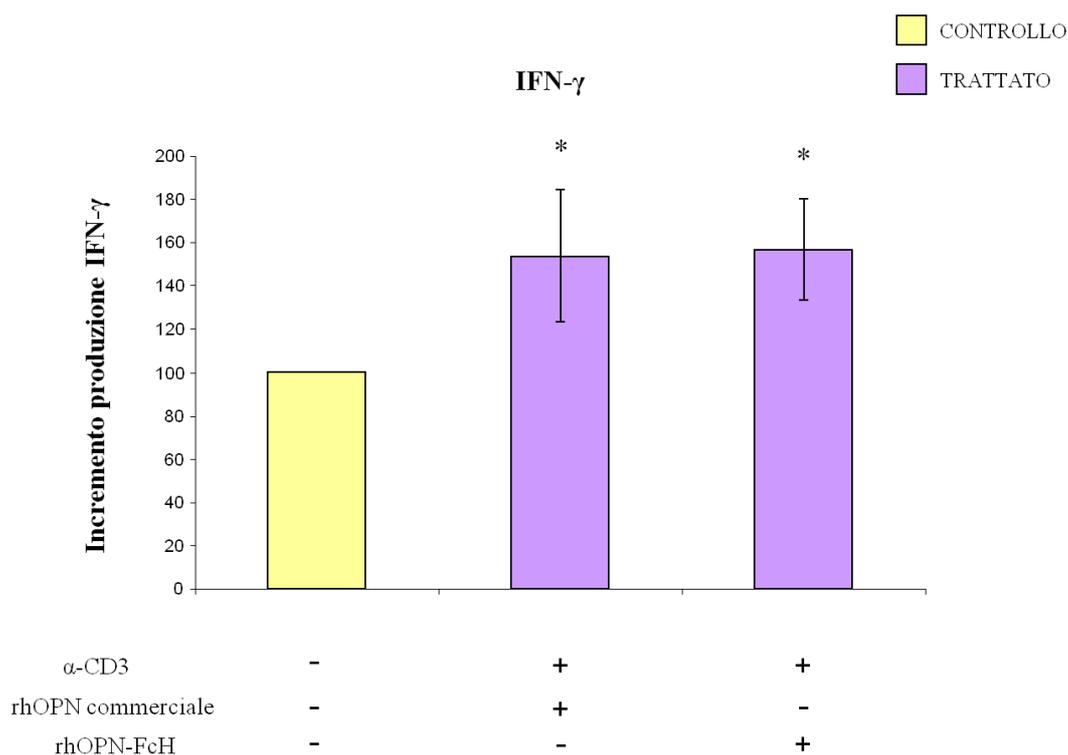


Figura 8. Incremento della produzione di IFN-gamma da parte di linfociti T totali CD4+ dopo stimolazione con rhOPN 1 μ g/ml. La produzione di IFN- γ nel campione non trattato è stata normalizzata al 100%. I valori assoluti sono pari a: non trattato, media 8.5 ng/ml +/- E.S. 2.6 ng/ml; attivato con anti-CD3 e stimolato con rhOPN commerciale, media 11.73 ng/ml +/- E.S. 3.55 ng/ml; attivato e trattato con rhOPN-FcH, media 11.69 ng/ml +/- E.S. 3.54 ng/ml. Il valore del *p value* è stato calcolato utilizzando il test statistico “Wilcoxon marched pairs signed-ranks test”; * *p* < 0.005.

rhOPN-FcH protegge dalla morte cellulare linfociti T attivati

Da precedenti studi effettuati nel nostro laboratorio è noto che OPN agisce come fattore protettivo sulla morte cellulare di linfociti T attivati. Il saggio di protezione dalla morte cellulare è stato pertanto utilizzato per valutare la funzionalità della proteina ricombinante rhOPN-FcH. Il tasso di mortalità è stato valutato sfruttando l'incorporazione del colorante Blu di Tripano da parte delle cellule morte. La % di sopravvivenza è stata ottenuta paragonando il numero di cellule vive (non colorate) nel campione attivato con anti-CD3 in presenza assenza di rhOPN-FcH con il punto sperimentale condotto in assenza della proteina ricombinante. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al campione non trattato e paragonati a quelli ottenuti in presenza della proteina commerciale rhOPN. Dal grafico mostrato in **figura 9** si osserva che entrambe le proteine ricombinanti proteggono dalla morte cellulare poiché in loro presenza si ha un aumento significativo di cellule vitali. L'incremento della % di vitalità cellulare risulta essere significativo utilizzando entrambe le proteine ricombinanti, e in maniera del tutto paragonabile.

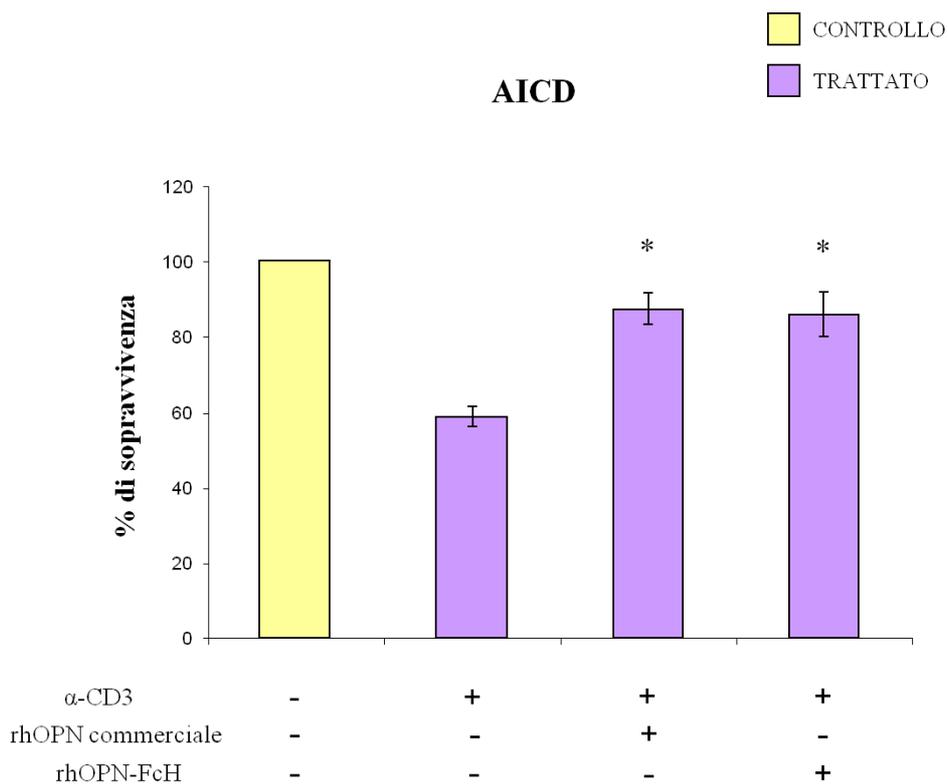


Figura 9. Protezione dalla morte cellulare da parte di linfociti T totali CD4+ dopo stimolazione con rhOPN 1 μ g/ml. La percentuale di sopravvivenza cellulare nel campione non trattato con OPN è stata normalizzata al 100%. Il valore del *p* value è stato calcolato utilizzando il test statistico "Mann-Whitney test"; * *p* < 0.005.

CLONAGGIO DEI RESTANTI MUTANTI DI OPN UMANA E MURINA

Allo scopo di studiare gli effetti del taglio della trombina sul ruolo patogenetico di OPN nella SM sono stati clonati i due frammenti derivanti dal taglio proteolitico di OPN (N- e C-terminale) e la proteina intera mutata a livello dei residui R168 ed S169 e quindi potenzialmente non clivabile. Inoltre sia la proteina murina wild-type, sia la molecola mutata che i frammenti N- e C-terminale sono stati fusi al Fc delle IgG murine.

Tutti i costrutti ottenuti sono stati trasfettati in cellule HeLa e la loro espressione è stata valutata mediante western blotting decorato sia con anticorpi diretti verso OPN (mappanti nella porzione N- o C-terminale) sia con un anti-SV5.

In **figura 10A** è mostrato un Western blot dei surnatanti di coltura di cellule HeLa trasfettate con i costrutti umani decorato con un anticorpo specifico per un epitopo di OPN che mappa all'estremità N-terminale. Come si può vedere sono state rivelate solo le proteine ricombinanti rhOPN N-ter+FcH e rhOPN Mut+FcH che presentano l'epitopo riconosciuto da tale anticorpo, mentre il segnale dato dal costrutto ricombinante che possiede solo il frammento C-terminale di OPN è paragonabile a quello dato dal surnatante di coltura di cellule non trasfettate. Allo stesso modo l'anticorpo anti-OPN diretto verso un epitopo C-terminale della proteina rileva solo le proteine chimeriche rhOPN C-ter+FcH ed rhOPN Mut+FcH, che possiedono tale epitopo (**figura 10B**). Tutti e tre i costrutti sono invece riconosciuti dall'anticorpo diretto contro il tag SV5, dando un segnale della taglia attesa (**figura 10C**).

Al contrario i costrutti murini sono stati riconosciuti solo dall'anticorpo anti SV5. Tutti quanti danno un segnale della taglia attesa, come mostrato in **figura 10C**.

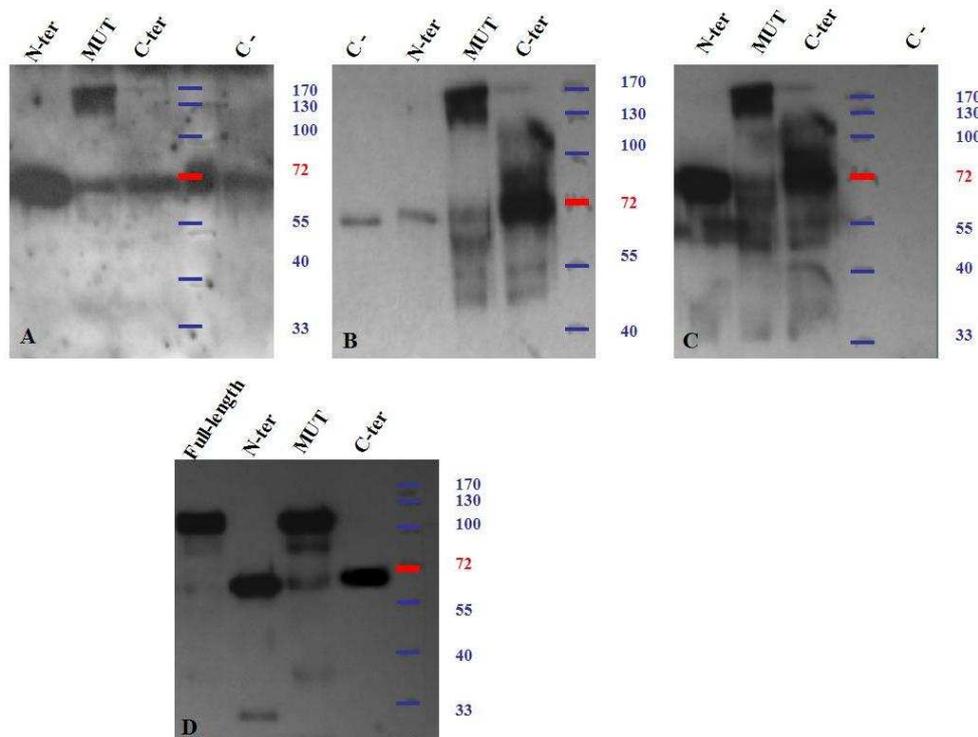


Figura 10. Western Blotting dei surnatanti di coltura di HeLa trasfettate con i plasmidi codificanti per i mutanti di OPN umana e murina. **A)** analisi dei costrutti umani mediante anticorpo che mappa un epitopo N-terminale di OPN. **B)** analisi dei costrutti umani con un anticorpo diretto contro un epitopo C-terminale di OPN **C)** western blotting anti SV5 tag dei costrutti umani. **D)** western blotting anti SV5tag dei surnatanti di coltura di cellule HeLa trasfettate con i costrutti murini di OPN fusi al Fc delle IgG murine.

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria e demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), mediata da una risposta autoimmune dei linfociti T helper proinfiammatori (TH1) e dei linfociti T citotossici (CTL) contro antigeni della guaina mielinica.

Diversi studi indicano che un ruolo nella patogenesi della malattia è giocato da OPN. Questa proteina inoltre sembra essere implicata nelle ricadute neurologiche della forma RR della malattia. OPN agisce mediante due meccanismi: 1) stimola l'espressione di mediatori pro-infiammatori nelle lesioni neurologiche e 2) inibisce l'apoptosi di linfociti T autoreattivi.

Durante l'infiammazione OPN è substrato di taglio della Trombina, che determina la formazione di due frammenti: N- e C-terminale. Il ruolo patogenetico di tali frammenti nella SM e nel suo modello sperimentale EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale) è, ad oggi, poco chiarito e potrebbe essere cruciale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Al fine di studiare l'attività dei due frammenti di OPN *in vivo* (nel topo) e *in vitro* (nel topo e nell'uomo) sono stati preparati costrutti ricombinanti della proteina full-length umana e murina, e dei rispettivi frammenti N- e C-terminale.

Il taglio proteolitico della Trombina determina l'esposizione, nel frammento N-terminale, di due siti critici di legame all'integrina $\alpha 4 \beta 1$ espressa dai linfociti T. L'interazione di OPN con questa integrina è di particolare interesse perché potrebbe essere importante per la migrazione dei linfociti nel SNC. Infatti anticorpi diretti verso la catena $\alpha 4$ o $\beta 1$ sono in grado di bloccare il legame dei linfociti T autoreattivi all'endotelio infiammato della barriera ematoencefalica e inibiscono lo sviluppo dell'EAE [67]. Il frammento C-terminale di OPN è responsabile dell'interazione con il recettore CD44, sia nella molecola intera che in quella clivata. Entrambi questi frammenti, sia umani che murini, sono stati clonati *in frame* con la sequenza codificante per il Fc delle Ig. Inoltre, sia per la OPN umana che per quella murina, è stato generato un terzo mutante corrispondente alla proteina full-length mutata nel sito di taglio della Trombina e quindi potenzialmente incapace di generare i due frammenti e di legare l'integrina $\alpha 4 \beta 1$.

Al fine di aumentare la produzione delle molecole ricombinanti, di ottimizzare la loro farmacocinetica e di ridurre la tossicità, è stato deciso di produrle applicando il concetto delle immunoadesine. Queste sono proteine chimeriche immunoglobulina (Ig)-simili costituite dalla proteina di interesse fusa al frammento costante e alla regione cerniera delle Ig; esse sono disegnate per avere una lunga emivita e proprietà simili a quelle degli anticorpi [70-72].

La produzione delle proteine ricombinate di OPN ha previsto, per ciascuna di esse, due clonaggi sequenziali. In primo luogo il cDNA di interesse, mancante della sequenza leader, è stato inserito

nel vettore pcDNA3.1 Hygro-Fc. Questo passaggio ha permesso di clonare ciascun mutante in frame con le catene CH2-CH3 delle IgG1 (umane o murine) e con il tag SV5. Inoltre il plasmide utilizzato presenta, a monte del sito di inserzione, la sequenza leader delle Ig e questo consente di ottenere, dopo trasfezione, la proteina ricombinante nel mezzo di coltura.

Una delle difficoltà che si incontrano nella produzione delle immunoadesine è quella di ottenere rese elevate e costanti della proteina ricombinante. Per ovviare a tale problema è stato utilizzato il vettore pUCOE-MB, anch'esso ingegnerizzato dal gruppo di lavoro del Prof. Sblattero. Questo vettore di espressione eucariotico si basa sull'utilizzo degli elementi di espressione UCOE (*ubiquitously-acting chromatin opening elements*) e permette la produzione di più di 10mg di proteina ricombinante per ogni litro di surnatante di coltura. Gli elementi UCOE sono isole CpG non metilabili presenti nel promotore di geni housekeeping che fanno sì che la cromatina intorno al transgene integrato sia in uno stato conformazionale aperto e quindi sia trascrizionalmente attiva. L'utilizzo di questi elementi permette quindi di massimizzare la trascrizione genica, e di conseguenza la traduzione proteica, in maniera indipendente dalla posizione del transgene sul cromosoma.

Come prima cosa si è deciso di procedere alla produzione e alla caratterizzazione della proteina umana full-length.

La presenza della proteina ricombinante nel surnatante di coltura di cellule HeLa trasfettate è stata valutata mediante western blotting decorato con un anticorpo specifico per OPN. La presenza del tag SV5 ha invece permesso di valutare l'integrità dell'immunoadesina. La presenza del Fc delle IgG1 umane ha consentito una semplice purificazione mediante cromatografia per affinità su colonna di proteina A.

Inoltre l'analisi mediante ELISA del surnatante di coltura ha permesso di verificare che la porzione di OPN nella molecola rhOPN-FcH presenta una corretta conformazione tridimensionale. La presenza di una OPN umana ricombinante commercialmente disponibile, e da anni utilizzata nel nostro laboratorio in saggi *in vitro*, ci ha permesso quindi di caratterizzare la proteina ricombinante rhOPN-FcH confrontandola con quella commerciale e di validare, allo stesso tempo, il nostro piano sperimentale. Gli esperimenti di induzione di IFN- γ e di AICD da parte di PBMCs attivati hanno dimostrato che la proteina ricombinante da noi prodotta ha un'azione del tutto paragonabile con la OPN commerciale, e che il Fc non ne influenza l'attività.

Pertanto, si è deciso di utilizzare la stessa strategia per produrre i mutanti di OPN. In particolare sono stati clonati:

- il frammento N-terminale, che si estende dall' aa 17 al 168 ed espone la sequenza 162-SVVYGLR-168 responsabile della interazione con l'integrina $\alpha 4\beta 1$. Tale interazione

potrebbe favorire la migrazione dei linfociti autoreattivi attraverso la barriera ematoencefalica;

- il frammento C-terminale, che si estende dall' aa 163 al 314, ed è responsabile della interazione con alcune isoforme del recettore CD44. Il ruolo patogenetico di questa interazione nella SM non è chiaro. Essa potrebbe mediare stimoli anti-apoptotici
- un mutante di OPN mancante del sito di taglio della trombina, localizzato tra gli aa R168 ed S169 che sono stati mutati in S168 e F169. Questo mutante è potenzialmente incapace di generare i due frammenti N- e C-terminale

Una identica strategia è stata inoltre usata per clonare le corrispondenti proteine murine fuse al Fc delle IgG di topo.

Questi costrutti sono stati sequenziali e trasfettati in cellule HeLa. Il relativo surnatante di coltura è stato analizzato mediante western blotting con anticorpi specifici per la due metà di OPN e contro il tag SV5. Per ciascun costrutto saranno prodotti cloni di cellule HeLa capaci di esprimere stabilmente la relativa proteina chimerica. Ulteriori studi dovranno essere effettuati per caratterizzare queste molecole. In particolare sarà testata la struttura conformazionale delle proteine chimeriche prodotte mediante allestimento di saggi ELISA con anticorpi specifici per i singoli frammenti di OPN e per i costrutti murini. Inoltre i costrutti, umano e murino, non clivabili saranno saggiati per la effettiva resistenza al taglio da parte della trombina.

Dopodiché i costrutti così prodotti e validati saranno utilizzati in saggi *in vitro* e *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. de Lemos Rieper C, Galle P, Hansen MB. (2009) *Cytokine Growth Factor Rev.* **1**, 61-75.
3. Lassmann H. (2002) *Clinical Neurology and Neurosurgery* **104**, 168-71
4. Cannella B., Raine C. (1995) *Annals of Neurology* **37**, 424-35
5. Hauser S.L., Fleischnick E., Weiner H.L., Marcus D., Awdeh Z., Yunis E.J., Alper C.A. (1989) *Neurology* **39**, 275-7
6. Burmham J.A., Wright R.R., Dreisbach J., Murray R.S. (1991) *Neurology* **41**, 1349-54
7. Stone L.A., Frank J.A., Albert P.S., Bash C., Smith M.E., Maloni H., McFarland H.F. (1995) *Annals of Neurology* **37**, 611-9
8. Tourtellotte W.W. (1985) *Handbook of Clinical Neurology* **133**, 124-140
9. Swanborg R.H. (1995) *Clinical Immunology and Immunopathology* **77**, 4-13
10. Fritz R.B., McFarlin D.E. (1989) *Chemical Immunology* **46**, 101-25
11. Fluger A., Berkowicz T., Ritter T., Labeur M., Jenne D.E., Li Z., Ellwart J.W., Willem M., Lassmann H., Wekerle H. (2001) *Immunity* **14**, 547-60
12. Owens T., Wekerle H., Antel J. (2001) *Nature Medicine* **7**, 161-6
13. Steinman L. (1997) *The Journal of Experimental Medicine* **185**, 2039-41
14. Hohlfeld R., Wiendl H. (2001) *The Annals of Neurology* **49**, 281-4
15. Martin R., Sturzebecher C.S., McFarland H.F. (2001) *Nature Immunology* **2**, 785-8
16. Steinman L. (1996) *Cell* **85**, 299-302
17. Weiner H. (2004) *Archives of Neurology* **61**, 1613-15
18. Bar-Or A., Oliveira E.M., Anderson D.E., Hafler D.A. (1999) *The Journal of Neuroimmunology* **100**, 252-9
19. Lassman H., Ranshoff R.M. (2004) *Trends in Immunology* **25**, 132-7
20. Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T, Bruck W (2000) *Brain* **123**, 1174-83
21. Johnson A.J., Suidan G.J., McDole J., Pirko I. (2007) *International Reviews of Neurobiology* **79**, 73-97
22. Denhardt D.T. , Noda M., O'Regan A.W., Pavlin D., Berman J.S. (2001) *The Journal of Clinical Investigation* **9**, 1055-61
23. Gravalles E.M. (2003) *The Journal of Clinical Investigation* **112**, 147-9
24. Mazzali M., Kipari T., Ophascharoensuk V., Wesson J.A., Johnson R., Hughes J. (2002) *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians* **95**, 3-13
25. Naldini A., Leali D., Pucci A., Morena E., Carraro F., Nico B., Ribatti D., Presta M. (2006) *The Journal of Immunology* **177**, 4267-70
26. O'Regan A.W., Nau G.J., Chupp G.L., Berman J.S. (2000) *Immunology Today* **10**, 475-8
27. Standal T, Borset M, Sundan A. (2004) *Experimental Oncology* **26**, 179-84
28. Prince C.W., Oosawa T., Butler W.T., Tomana M., Bhowan A.S., Bhowan M., Schrohenloher R.E. (1987) *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 2900-7
29. Senger D.R. (1996) *American Journal of Pathology* **149**, 293-305
30. Mitsiades N., Wei-Hsuan Yu, Poulaki V., Tsokos M., Stamenkovic I. (2001) *Cancer Reserch* **61**, 577-81
31. O'Regan A., Berman J.S. (2000) *International Journal of Experimental Pathology* **81**, 373-90
32. Denhardt D.T., Noda M., O'Regan A.W., Pavlin D., Berman J.S. (2001) *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 1055-61
33. Ashkar S., Weber G.F., Panoutsakopoulou V., Sanchirico M.E., Jansson M., Zawaideh S., Rittling S., Denhardt D.T., Glimcher M.J., Cantor H. (2000) *Science* **287**, 860-4
34. Young M.F., Kerr J.M., Termine J.D., Wewer U.M., Wang M.G., McBride O.W., Fisher L.W. (1990) *Genomics* **4**, 491-502

35. Giacomelli F., Marciano R., Pistorio A., Catarsi P., Caninoi S., Karsenty G., Ravazzolo R. (2004) *Physiological Genomics* **20**, 87-96
36. Shinohara M.L., Kim H.J., Kim J.H., Garcia VA, Cantor H. (2008) *PNAS* **105**, 7235-9
37. Shinohara M.L., Kim J.H, Garcia V.A, Cantor H. (2008) *Immunity* **29**, 68-78
38. Denhardt D.T., Giachelli C.M., Rittling S.R. (2001) *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **41**, 723-49
39. O'Regan A.W., Chupp G.L., Lowry J.A., Goetschkes M., Mulligan N., Berman J.S. (1999) *Journal of Immunology* **162**, 1024-31
40. Rollo E.E., Denhardt D.T. (1996) *Immunology* **4**, 642-7
41. Lin Y.H., Yang-Yen H.F.(2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 46024-30
42. O'Regan A.W., Hayden J.M., Berman J.S. (2000) *Journal of Leukocyte Biology* **68**, 495-502
43. Hashimoto M.D., Sun S.R., Rittling D.T., Denhardt D.T., Young W. (2007) *The Journal of Neuroscience* **27**, 3603-11
44. O' Regan A., Berman J.S. (2000) *International Journal of Experimental Pathology*; **81**, 373-90
45. Hur E.M., Youssef S., Haws M.E., Zhang S.Y., Sobel R.A., Steinman L.(2007) *Nature Immunology* **8**, 74-83
46. Stromnes I.M., Goverman J.M. (2007) *Nature Immunology* **8**, 19-20
47. Guo H.Q., Cai R., Schroder A., Kuo P.C. (2001) *The Journal of Immunology* **166**, 1079-86
48. Takahashi F., Takahashi K., Maeda K., Tominaga S., Fukuchi Y. (2001) *IUBMB Life* **49**, 100-3
49. Xanthou G., Alissafi T., Semitekoulou M., Simoes D.C.M., Economidou E., Gaga M., Lambrecht BN., Llyod C.M., Panoutsakopoulou V. (2007) *Nature Medicine* **13**, 570-88
50. Rangaswami H.A., Bulbule A., Kundu G.C. (2006) *Trends in Cell Biology* **16**, 79-87
51. Rittling S.R., Chambers A.F. (2004) *British Journal of Cancer* **90**, 1877-81
52. Wai P.Y., Kuo P.C. (2004) *Carcinogenesis* **26**, 741-51
53. Masutani K., Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, Fukuda K, Kanai H, Nakashima H, Otsuka T, Hirakata H. (2001) *Arthritis Rheumatism* **44**, 2097-106
54. Blom T., Franzen A., Heinegard D., Holmdahl R. (2003) *Science* **299**, 1845
55. Zhao C., Fancy S., Constant C., Franklin R. (2008) *Neurobiology of Disease* **31**, 209-17
56. Mirishima R, Takeshima F, Sawai T, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Omagari K, Mizuta Y, Ozono Y, Kohno S. (2007) *Journal of Clinical Gastroenterology* **41**, 167-72
57. Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J., Tolosa E. (2009) *Brain* **132**, 3329-41
58. Kwan B.C., Tam L.S., Lai K.B., Lai F.M., Li E.K., Wang G., Chow K.M., Li P.K., Szeto C.C. (2009) *Rheumatology* **48**, 1491-7
59. Gaffen S.L. (2009) *Current Rheumatology Reports* **11**, 365-70
60. Diveu C, McGeachy M.J, Boniface K, Stumhofer J.S, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato C.M, McClanahan T.K, de Waal Malefyt R, Hunter C.A, Cua D.J, Kastelein R.A.. (2009) *Journal of Immunology* **182**, 5748-56
61. Bird L. (2007) *Nature Immunology* **7**, 7
62. Chiocchetti A., Comi C., Indelicato M., Castelli L., Mesturini R., Bensi T., Mazzarino MC., Giordano M., Momigliano-Richiardi P., Liguori M., Zorzon M., Amoroso A., Trojano M., Monaco F., Leone M., Magnani C., Dianzani U. (2005) *The Journal of Neuroimmunology* **163**, 172-8
63. D'Alfonso S., Barizzone N., Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacomelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli M.G, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini M.G, Baldissera E, Galeazzi M, sebastiani G.D, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Somigliano-Richiardi P. (2005) *Arthritis and Rheumatism* **5**, 539-47.

64. Chabas D., Baranzini S.E., Mitchell D., Bernard C.C., Rittling S.R., Denhardt D.T. (2001) *Science* **294**, 1731-5
65. Vogt M.H., Lopatinskaya L., Smits M., Polman C.H., Nagelkerken L. (2003) *Ann Neurol* **53**, 819-22
66. Theofilopoulos, A. N. & Dixon, F. J. (1981) *Immunol. Rev.* **55**, 179–216.
67. Caillier S, Barcellos LF, Baranzini SE, Swerdlin A, Lincoln RR, and Steinman L Martin E, Haines JL, Pericak-Vance M, Hauser SL, Oksenberg JR; (2003) *Genes Immun*; **4**, 312–315.
68. Steinman L. Multiple sclerosis: a two stage disease. (2001) *Nature Immunol.* **2**, 762–765.
69. Steinman, L., Martin, R., Bernard, C., Conlon, P. & Oksenberg, J. R. (2002) *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 491–505.
70. Sakata M, Tsuruha JI, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Matsui T, Sudo A, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies (2001) *J Rheumatol.* **7**, 1492-5
71. Fierabracci A, Biro PA, Yiangou Y, Mennuni C, Luzzago A, Ludvigsson J, Cortese R, Bottazzo GF. (1999) *Vaccine.* **3-4**, 342-54
72. Yamamoto N, Nakashima T, Torikai M, Naruse T, Morimoto J, Kon S, Sakai F, Uede T. Int (2007) *Immunopharmacol.* **11**, 1460-70

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2009/10

Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression

Prof. Nicolas Mermoud

30/11/09

Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare

Dott. Fabio GRASSI

14/12/09

Tecnologia MACS® La soluzione completa per la separazione immunomagnetica

Enrico Ghersi

Product Specialist - Miltenyi Biotec

21/12/09

LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation

DR. Elena Battaglioli

20/01/10

Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche

Prof. Giulio Alessandri

21/01/10

Dal difetto genetico all'infiammazione

Dott. Luigi Maiuri

28/01/10

R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs

Dott. Giovanni Baldi

09/02/10

A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6

Prof. Alfredo GARZINO-DEMO

11/02/10

Computational analysis of protein-protein interactions

Prof. Stefano Pieraccini

17/02/10

Il recupero del cammino dopo lo stroke, mediante utilizzo di mezzi robotici, farmacologici e chirurgici

Dott. Stefano CARDA

18/02/10

Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda.

Prof. Francesco Cucca

03/03/10

4D IMAGING OF TUMOR PROTEOLYSIS:IMPACT OF MICROENVIRONMENT

Dott. Bonnie F. Sloane

10/05/10

Prediction of RNA-RNA interaction

Dr. Hakim Tafer

26/05/10

Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints

Prof. Mamoru Senna

04/06/10

Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi

Dott. Carola Ponzetto

10/06/10

Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni

Dott.ssa Marta Mellai

Dott.ssa Valentina Cardera

14/06/10

Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison

Dr. Steven R. Ellis

17/06/10

Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma

Dott. Franco Novelli

30/06/10

Role of membrane lipids in neuronal synapses organization

Dott. Paola Camoletto

05/07/10

Tissue Transglutaminase, a polyhedric enzyme: friend or foe?

Dott. Dario Fortunati

06/07/10

Ruolo delle micro vescicole nella comunicazione tra cellule

Dott. Giovanni Camussi

06/09/10

Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica

Dott. Ruggero De Maria

22/09/10

New aspects of Cathepsin E functions in host defense mechanisms

Prof. Kenji Yamamoto

22/09/10

Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy

Dr. Steven R. Ellis

23/09/10

Low-dose Bafilomycin is cytoprotective against Lysosome dysfunction, Implication of an Autophagy-associated therapeutic target for Neurodegenerative disease

Dott. John Shacka

24/09/10

A self-antigen peptidome carried by the human lymph

Prof. Laura Santambrogio

24/09/10

II lezione introduttiva- Oncologia

Prof. Emanuele Albano

31/05/10

III lezione introduttiva- Oncologia

Prof. Emanuele Albano

18/06/10

CONGRESSI FREQUENTATI I ANNO:

LE MALATTIE AUTOIMMUNI: DAL LABORATORIO AL PAZIENTE. La ricerca scientifica a Novara (**Convegno IRCAD**) 26/02/10

SCUOLA DIANZANI, Novara 11-12/12/2009

CONGRESSO SIP 2010 Salerno 14-17 Ottobre 2010