

*Università degli Studi del Piemonte Orientale*

*“Amedeo Avogadro”*

*Dipartimento di Scienze Mediche*



*Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare*

*Ciclo XXVI (2010-2013)*

**UPAR E OPN, STUDI SUL MECCANISMO DI REGOLAZIONE**

**IL TRATTAMENTO CON UN ANTICORPO NEUTRALIZZANTE IL-17**

**MIGLIORA LO STATO DI MALATTIA IN TOPI MRL/LPR**

*Candidato: Nausicaa Clemente*

*Tutor e Relatore: Prof. Umberto Dianzani*

# ***INDICE***

## **INTRODUZIONE**

- 1. LA SEPSI**
- 2. UPAR (RECETTORE DEL PLASMINOGENO ATTIVATO DI TIPO UROCHINASI)**
  - 2.1 Struttura e meccanismo d'azione*
  - 2.2 Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione*
- 3. OPN (OSTEOPONTINA)**
  - 3.1 Caratteristiche strutturali e funzionali*
  - 3.2 Ruolo nell'infiammazione*
- 4. RELAZIONE TRA I DUE MARCATORI BIOLOGICI: OPN E SUPAR**
- 5. L'AUTOIMMUNITA'**
  - 5.1 Le malattie autoimmuni e i difetti apoptotici*
  - 5.2 Eziologie e patogenesi delle malattie autoimmuni*
- 6. LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS)**
  - 6.1 Caratteristiche cliniche*
  - 6.2 Il modello dei topi lpr e gld*
- 7. IL-17 (INTERLEUCHINA 17)**

## **SCOPO GENERALE DELLA TESI**

## **MATERIALI E METODI**

## **RISULTATI**

## **DISCUSSIONE**

## **PROSPETTIVE FUTURE**

## **BIBLIOGRAFIA**

# ***INTRODUZIONE***

## **1. LA SEPSI.**

La sepsi è una condizione morbosa il cui evento iniziale è l'ingresso nell'organismo di una dose elevata di antigeni batterici che invadono il torrente ematico. Questo determina l'attivazione dei meccanismi di difesa messi in atto dal sistema immunitario al fine di rimuovere tale invasione. Da un punto di vista clinico la sepsi è un'entità complessa, e la necessità di un linguaggio comune per una corretta interpretazione clinica ha portato alla pubblicazione, nel 1992 (American College), delle definizioni di sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), sepsi, sepsi grave (SG) e shock settico (SS). Con il termine SIRS, si definisce una condizione di risposta infiammatoria sistemica ad un insulto di origine non infettiva quale un trauma, un insulto chimico o termico. Clinicamente è definita dalla presenza di due o più dei seguenti criteri:

- 1) Temperatura orale  $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- 2) Conta leucocitaria  $<4000/\mu\text{l}$  o  $>12000/\mu\text{l}$  o presenza allo striscio di sangue periferico di un numero maggiore del 10% di polimorfonucleati immaturi,
- 3) Tachipnea, ovvero una frequenza respiratoria maggiore di 20 atti respiratori al minuto o  $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$ ,
- 4) Tachicardia, ovvero frequenza cardiaca  $>90$  battiti al minuto. Il consenso per tale definizione non è unanime, essendo i criteri proposti troppo generali.

La sepsi è stata definita come la presenza dello stato di SIRS accompagnato però da un'infezione accertata o anche solo presunta, rendendo difficile la distinzione tra SIRS e sepsi, quindi è necessario avere a disposizione degli strumenti o dei biomarcatori per diagnosticare precocemente la sepsi e definire i pazienti ad alto rischio che necessitano di un trattamento aggressivo.

## **2. UPAR (RECELTTORE DEL PLASMINOGENO ATTIVATO DI TIPO UROCHINASI).**

Molti eventi fisiologici e patologici come embriogenesi, ovulazione, riparazione delle ferite, angiogenesi, infiammazione, invasione e metastatizzazione tumorale, si basano sull'abilità delle cellule di migrare e invadere i tessuti. La migrazione cellulare è strettamente legata alla riorganizzazione del citoscheletro, all'adesione a cellule vicine e alla degradazione della matrice extra cellulare circostante.

Il sistema di attivazione del Plasminogeno di tipo Urochinasico (uPA) è coinvolto in tutte queste funzioni. La molecola centrale del sistema (uPAR), tramite l'interazione con i propri ligandi e l'attivazione del Plasminogeno a Plasmina, è in grado di regolare l'attività proteolitica a livello della superficie cellulare, l'adesione cellulare alla matrice extra-cellulare e il rimodellamento tissutale.

Esiste poi una forma solubile di tale recettore (suPAR) che amplia ulteriormente lo spettro di azione e le funzioni del sistema di attivazione del Plasminogeno di tipo Urochinasico. <sup>[1]</sup>

### **3.1 Struttura e meccanismo d'azione**

Il Recettore dell'Attivatore del Plasminogeno di tipo Urochinasico (uPAR o CD87) è un componente fondamentale nel sistema di attivazione del Plasminogeno, un sistema di Serin-proteasi coinvolte in: trombolisi, infiammazione, fertilità, migrazione cellulare, rimodellamento tissutale, invasione tumorale e vascolarizzazione. <sup>[2]</sup>

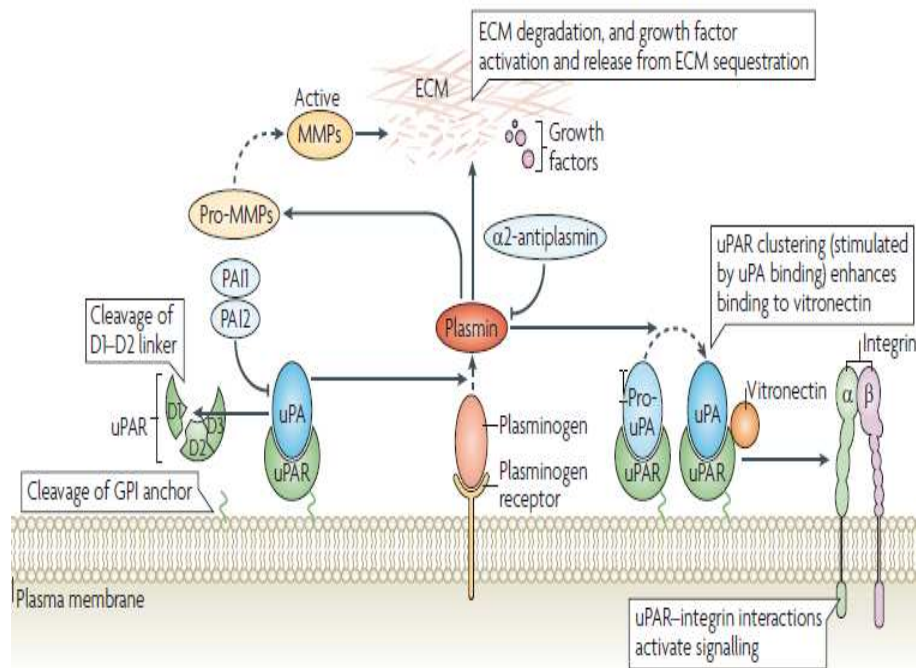
uPAR è una proteina altamente glicosilata di 50-65 kD, sintetizzata come una singola catena polipeptidica di 313 amminoacidi, con gene situato a livello del cromosoma 19. <sup>[2;3;4]</sup>

In seguito ad una serie di modificazioni post-traduzionali, la proteina viene legata alla membrana plasmatica cellulare tramite un'ancora di Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI). <sup>[5]</sup> Il recettore è costituito da tre domini che, a partenza dall'N-terminale sono: D1,D2,D3. <sup>[2]</sup>

uPAR è stato inizialmente identificato come il recettore dell' Urochinasasi (uPA), con il ruolo di concentrare l'attivazione proteolitica del Plasminogeno a Plasmina sulla superficie di cellule in migrazione. La Plasmina infatti, degrada componenti della matrice extra cellulare sia direttamente che indirettamente, attraverso l'attivazione delle metalloproteasi (MMPs). <sup>[6]</sup> uPAR puo' inoltre legare la proteina Vitronectina, nota anche come proteina S (sierica o a livello della matrice extra cellulare), forme clivate del Chininogeno ad alto peso molecolare e diverse integrine. <sup>[2]</sup>

La presenza di un adattatore trans-membrana è di fondamentale importanza per la trasduzione del segnale via uPAR. <sup>[5]</sup> L'interazione puo' avvenire con almeno due categorie di proteine trans-membrana: le integrine e la famiglia dei recettori associati a proteine G, in particolare il FPRL1 (*Formyl Peptide Receptor*). In condizioni di riposo o in caso di stimoli che favoriscano l'adesione cellulare e la proliferazione, il signalling avverrebbe soprattutto attraverso l'interazione uPAR-integrine; l'interazione del recettore con FPRL1, invece, favorirebbe la migrazione cellulare stimolata da uPA-uPAR.

Queste interazioni sono schematizzate nella **Figura 1**.



**Figura 1. Funzione e regolazione del sistema uPA/uPAR**

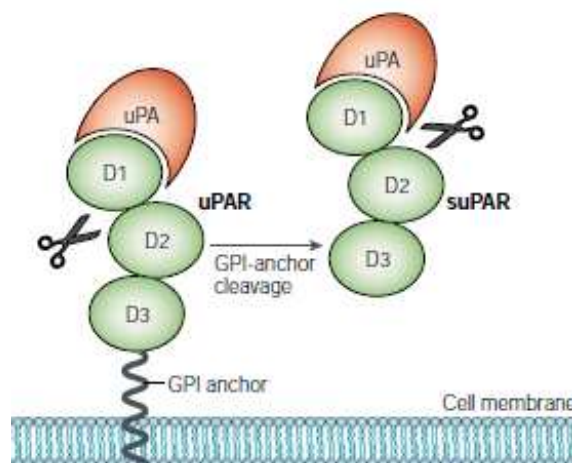
La forma solubile del Recettore Urochinasico dell'Attivatore del Plasminogeno, suPAR, è rilasciato dalla membrana plasmatica in seguito al clivaggio dell'ancora GPI. **Figura 2.** La rottura proteolitica del legame può avvenire ad opera di Tripsina, Chimotripsina, Elastasi, Catepsina G, metalloproteasi ma anche di Plasmina e uPA stesso. Sia uPAR, che suPAR possono essere clivati nella regione che collega il dominio D1 al dominio D2 con la formazione di un frammento "D1" e un frammento "D2D3" (c-uPAR e c-suPAR).<sup>[6]</sup>

Queste porzioni libere del recettore non sono solo prodotti di degradazione ma sono dotate di funzioni indipendenti, in parte ancora da chiarire.

L'aumento delle forme clivate e solubili del recettore è in parte legato ad una aumentata espressione del recettore stesso a livello della superficie cellulare, tuttavia, è anche possibile che queste forme solubili siano regolate indipendentemente e siano legate ad un aumento delle cellule esprimenti uPAR che possono secernere la forma solubile del recettore come: monociti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cellule tumorali.<sup>[7;8]</sup> Questo rilascio indipendente dall'espressione superficiale del recettore determina probabilmente una conseguente regolazione dell'adesione e migrazione cellulare da parte di suPAR con meccanismi peculiari.<sup>[2]</sup> E' stato infatti dimostrato che il frammento D2D3 è dotato di diretta attività chemiotattica.<sup>[6;9]</sup> Inoltre le forme solubili del recettore mantengono la capacità di

interagire con i ligandi, mediando quindi attività simili alla forma di membrana del recettore.

[10]



**Figura 2. Siti di clivaggio proteolitico di uPAR.** Il recettore è ancorato tramite il residuo GPI alla membrana plasmatica) e suPAR (forma solubile del recettore).<sup>[98]</sup>

suPAR lega gli stessi ligandi di uPAR: uPA, forme clivate del Chininogeno ad alto peso molecolare e le Beta1 e Beta2 integrine, ma non il recettore FPRL1 (Formyl Peptide Receptor).<sup>[2;11]</sup> suPAR può così competere con il recettore di membrana uPAR per il legame ai recettori extracellulari, riducendo quindi l'attività proteolitica di uPA a livello della superficie cellulare e l'adesione cellulare a Vitronectina; tuttavia, il recettore solubile può ancora attivare le integrine, inducendo quindi l'adesione cellulare all'endotelio.<sup>[11]</sup>

### **3.2 Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione**

L'intero sistema uPA/uPAR/suPAR è coinvolto nel processo di risposta immunitaria in particolare tramite l'azione fibrinolitica e chemiotattica sulle cellule immunitarie.

Anche se l'espressione di uPAR è favorita dall'infiammazione, il ruolo del sistema uPA/uPAR nella flogosi è eterogeneo; da un lato, il sistema, svolge un'azione anti-infiammatoria degradando e prevenendo la deposizione extracellulare di fibrina; dall'altro lato però, ha un ruolo importante nel garantire un'adeguata risposta immunitaria innata ed adattativa regolando l'adesione e la migrazione delle cellule immunitarie.

suPAR, così come le forme clivate del recettore solubile sono potenti mediatori dell'adesione e migrazione monocitaria. Il sistema ha quindi un importante ruolo nella difesa dalle infezioni, un ruolo anti-infiammatorio (tramite l'azione fibrinolitica) ma anche pro-infiammatorio a causa del reclutamento delle cellule immunitarie.<sup>[13]</sup>

L'espressione e l'attivazione del sistema in corso di infezioni batteriche sono legate alla produzione di endotossine e citochine pro-infiammatorie.

L'aumento dei livelli di suPAR è predittivo di mortalità in pazienti con HIV, batteriemia pneumococcica, meningite batterica, Tubercolosi, Malaria, febbre emorragica ma anche in pazienti senza una diagnosi nota di infezione. <sup>[14;15]</sup>

I livelli di suPAR nell'HIV sono aumentati a livello del siero, dei tessuti e delle urine e hanno un importante valore prognostico e di severità di malattia paragonabile alla conta dei linfociti T CD4+; i livelli ematici di suPAR sono inoltre ridotti dalla terapia antiretrovirale (HAART).

<sup>[16]</sup> La valutazione dei livelli sierici di suPAR è stata proposta quale indicatore prognostico in pazienti con infezioni virali, batteriche, parassitarie, batteriemia e sepsi in numerosi studi. <sup>[13;14;17;18]</sup> In questi casi, elevati livelli del recettore solubile, con un cutoff tra 10-11 ng/ml proposto da Eugen-Olsen et al e Wittenhagen et al., <sup>[14;17]</sup> erano strettamente associati alla gravità delle condizioni del paziente, alla riduzione della pressione arteriosa media e alla necessità di ricorrere alla ventilazione meccanica con una previsione di esito fatale paragonabile allo score di valutazione di insufficienza d'organo (SOFA score). <sup>[14;18]</sup> I livelli di suPAR misurati durante la fase acuta di malattia erano indicativi della sopravvivenza sia a breve che a lungo termine. <sup>[13]</sup> Da questo studio è risultata inoltre un'elevazione dei livelli del marcatore in caso di abuso alcolico, patologia epatica e cirrosi oltre che negli anziani, con un annullamento però di questo trend in caso di infezione attiva; <sup>[18]</sup> l'associazione con l'età non è stata confermata in successivi studi. <sup>[13]</sup> Grazie agli studi su pazienti critici con multi-organ-failure (MOF) si è dimostrata una clearance sia di tipo renale che biliare di suPAR con una correlazione diretta tra livelli di suPAR e filtrato glomerulare ed indiretta con gli indici di colestasi. <sup>[13]</sup>

suPAR potrebbe rappresentare anche un marker di infiammazione a basso grado ed essere predittivo dello sviluppo di Diabete Mellito di tipo 2, patologie cardiovascolari, neoplasie e mortalità generale a 10 anni. <sup>[14]</sup> suPAR è quindi un marcatore stabile di attivazione immunitaria e infiammazione cellulare dotato di particolare potere prognostico ma non diagnostico, a differenza di altri markers comunemente utilizzati oggi quali la PCR o la Pro-Calcitonina e con i quali dovrebbe essere valutato in modo complementare. Quest'ultimo aspetto è di particolare rilevanza nella diagnosi differenziale tra infiammazione ed infezione, soprattutto ai fini terapeutici nelle patologie autoimmuni ed infiammatorie. <sup>[19]</sup>

### 3. OPN (OSTEOPONTINA).

#### 3.1 Caratteristiche strutturali e funzionali.

OPN è una glicoproteina acida fosforilata a livello di diversi residui di serina ed è implicata in diversi eventi fisiologici e patologici tra i quali rimodellamento osseo, infiammazione, cancro, angiogenesi, patologie cardiovascolari e malattie autoimmuni. [20;21;22;] OPN esiste come proteina immobilizzata facente parte della matrice extracellulare ma anche come citochina solubile nei fluidi biologici, agendo come importante componente dei processi infiammatori e della risposta immunitaria. [23;24]

OPN è secreta principalmente dagli osteoblasti e dagli osteociti, dalle cellule renali epiteliali, dalle cellule vascolari del muscolo liscio, dalle cellule endoteliali ma è anche abbondantemente espressa dai linfociti T e B attivati, infatti, fu identificata come *Early T-cells Activation* (Eta-1), dai monociti-macrofagi, dalle cellule Natural Killer (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 R<sup>168</sup> S<sup>169</sup>. 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 metalloproteasi (MMP), 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  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  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. [25;26] OPN è in grado di interagire con diverse isoforme di CD44, in particolare con CD44<sub>v6-7</sub>, i quali mediano la funzione chemotattica di OPN e riducono l'espressione di IL-10 e IL-4, favorendo la produzione di IL-12. [23;20] CD44 è una proteina di membrana glicosilata, coinvolta nell'adesione e nell'*homing* dei linfociti. Sia il legame di OPN con le varianti di CD44 che con le integrine, polarizzano comunque i linfociti T verso una risposta di tipo-1. [27]



### **3.2 Ruolo nell'infiammazione.**

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 il *Tumor Growth Factor* (TGF)- $\alpha$  e IL-1, inducono la trascrizione di OPN, attraverso l'attivazione di *Protein Kinase C* (PKC).<sup>[20]</sup>

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*.<sup>[28]</sup> 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.<sup>[29]</sup> 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.<sup>[30]</sup>

OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli patologici *in vivo*, è espressa dagli istiociti nei granulomi di varia provenienza quali tubercolosi e 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.<sup>[23;31]</sup>

OPN controlla la proliferazione dei linfociti T, infatti, li stimola a differenziare, favorisce la produzione di INF- $\gamma$  e l'espressione di CD40L, con conseguente espressione di IL-12 e produzione di anticorpi da parte dei linfociti B.<sup>[23]</sup> Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione *Forkhead Box O3A*, (Foxo3a) e *Nuclear factor-kB* (NFkB).<sup>[32;33]</sup>

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).<sup>[34;35]</sup> 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).

#### **4. RELAZIONE TRA DUE MARCATORI BIOLOGICI, OPN E SUPAR.**

In alcuni studi in ambito oncologico, Osteopontina è stata correlata al sistema uPA, ligando di suPAR.

Osteopontina, attraverso l'interazione con il recettore CD44, induce la secrezione di uPA e l'attività di NFκB attivando le vie di signaling mediate da PI 3'-Kinasi/Akt/IKK favorendo quindi la motilità e l'invasività delle cellule neoplastiche. <sup>[37;38]</sup>

Tuttavia, una correlazione diretta tra OPN e suPAR non è ancora stata dimostrata.

#### **5. L'AUTOIMMUNITÀ.**

##### ***5.1 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.

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 (LES), e organo-specifiche, come ad esempio il diabete mellito di tipo1, 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.

### ***5.2 Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni.***

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. <sup>[39]</sup>

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.

## 6. LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS).

### 6.1 Caratteristiche cliniche.

La sindrome autoimmune linfoproliferativa, è una malattia autoimmune dell'infanzia, originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith. <sup>[40]</sup>

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. <sup>[41;42]</sup> 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.

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*. <sup>[43]</sup> 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. <sup>[44]</sup> Spesso in aggiunta, sono riscontrabili altre malattie autoimmuni, una storia familiare positiva per l'ALPS e mutazioni a carico del gene per Fas. <sup>[45;46]</sup>

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 autoimmune. <sup>[47]</sup>

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-2 e IFN- $\gamma$  e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1, favorendo indirettamente la linea Th2 e la crescita di linfociti B con successiva produzione di auto-anticorpi.

I criteri diagnostici e la classificazione dei pazienti affetti da ALPS sono stati recentemente rivisitati in base al difetto genetico causale. Viene riportata qui di seguito una schematizzazione.

<u>Nomenclatura precedente</u>	<u>Nomenclatura rivisitata</u>	<u>Gene coinvolto</u>	<u>Definizione</u>
ALPS Tipo 0	ALPS-FAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione omozigote germinale in Fas
ALPS Tipo Ia	ALPS-FAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione eterozigote germinale in Fas
ALPS Tipo Im	ALPS-sFAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione somatica in Fas
ALPS Tipo Ib	ALPS-FASLG	FASLG	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione germinale in Fas-Ligando
ALPS TIPO IIa	ALPS-CASP10	CASP 10	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione germinale in Caspasi 10
ALPS Tipo III	ALPS - U	Sconosciuto	Pazienti che rispettano i criteri diagnostici dell'ALPS; comunque i difetti genetici sono indeterminati (no sono presenti difetti in Fas, Fas-L o Caspasi 10)

Dalla tabella si evince, quindi, che i difetti genetici responsabili della malattia possono colpire anche altri geni oltre a Fas, quali Fas-L o caspasi 10.

L'ALPS quindi sembra presentare un quadro oligogenico e multifattoriale. Infatti, tra i pazienti esiste una grande variabilità clinica, non solo tra quelli con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione. Spesso la malattia è legata a mutazioni eterozigoti con dominanza incompleta e il genitore portatore della mutazione è in genere sano. <sup>[48]</sup> L'espressione della malattia può dipendere dalla co-presenza di altri fattori predisponenti di tipo genetico o ambientale. <sup>[49]</sup>

Studi compiuti nel nostro laboratorio ci hanno permesso di individuare il coinvolgimento dei linfociti Th17, con l'aumento dei livelli di IL-17, in tale malattia; questa ipotesi si fonda sul fatto che il topo MRL lpr presenta elevati livelli di IL-17, prodotti in gran parte dai linfociti T DN presenti a livello dei linfonodi.

Nel nostro laboratorio inoltre è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile a quello degli ALPS con: ridotta funzionalità di Fas, autoimmunità prevalentemente ematologiche, accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfoadenopatie e/o splenomegalia, ma privi della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico.

I linfociti T dei soggetti studiati sono resistenti alla morte cellulare indotta da Fas, ma non presentano mutazioni in Fas, FasL o caspasi-10. Inoltre, i linfociti T della maggior parte di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da etoposide, che agisce direttamente sulla via mitocondriale. La componente ereditaria della malattia è suggerita dal fatto che anche i genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (pur in assenza di malattia, come nell'ALPS). Inoltre, la fusione somatica dei linfociti T Fas-resistenti dei pazienti con una linea linfocitaria tumorale Fas-sensibile determina la produzione di cellule ibride Fas-resistenti. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono la via di Fas a valle del recettore e determinano la produzione di molecole che esercitano un'attività dominante negativa sulla funzione di Fas. Questa forma di ALPS è stata denominata DALD (*Dianzani's ALD*) da McKusick sul sito OMIM del NIH (riferimento OMIM #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

### **5.3 Il modello dei topo *lpr* e *gld*.**

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. Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da: linfadenopatia, splenomegalia, autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite, espansione policlonale in periferia di linfociti T TCR  $\alpha\beta^+$  privi di CD4 e CD8 e per questo detti “doppi negativi”. Essi sono bloccati allo stadio G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> del ciclo cellulare e probabilmente derivano da linfociti T maturi CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> o CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.

La tipica mutazione *lpr* è causata da un difetto di splicing e determina una ridotta espressione del recettore in membrana, mentre una variante della mutazione, la forma *lpr<sup>cg</sup>* è una mutazione puntiforme nel *Death Domain* (DD) del recettore Fas che ne riduce l'attività. La mutazione *gld* è invece una mutazione puntiforme nel dominio C-terminale di FasL che ne riduce la capacità di interagire con Fas. <sup>[50]</sup>

## **7. IL-17 (INTERLEUCHINA 17).**

Recentemente è stato identificato un nuovo sotto tipo di linfociti T CD4<sup>+</sup>, identificati con il nome di T-helper 17 (Th17), i quali svolgono un ruolo cruciale nell'infiammazione. La citochina chiave prodotta da questo tipo di linfociti effettori è IL-17, secreta anche da differenti tipi cellulari, in particolare linfociti TCR $\alpha\beta^+$ CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, dalle cellule *natural killer* e

dai neutrofili. E' noto il coinvolgimento dei linfociti Th17 in differenti malattie autoimmuni, quali la sclerosi multipla, il lupus eritematosus sistemico e l'artrite reumatoide. Elevati livelli di IL-17 sono stati riscontrati in pazienti affetti da SM ed è stata descritta la loro correlazione con gli stadi clinici della malattia. Inoltre, topi MRL/lpr presentano elevati livelli della citochina, prodotta in gran parte dai linfociti doppi negativi presenti a livello dei linfonodi. E' stato dimostrato che IL-17 è in grado di favorire la produzione di IgG anti-dsDNA, caratteristica clinica riscontrabile anche nei pazienti con ALPS. Dati recenti di letteratura, inoltre, hanno dimostrato come OPN sia in grado di favorire la produzione di IL-17 in pazienti affetti da artrite reumatoide, inibendo l'espressione di IL-27, noto inibitore di IL-17.

## ***SCOPO GENERALE DELLA TESI***

La sepsi severa è responsabile di un'ammissione su cinque in unità di terapia intensiva (ICU) ed è la principale causa di morte in ICU.

L'incidenza di sepsi, all'ammissione del paziente in ICU è pari al 4.5% sale, considerando anche i casi di insorgenza durante il ricovero, al 16.3%. La mortalità per sepsi è del 36% e raggiunge il 52% nei casi di SG e l'81% nei casi di SS. Studi più recenti hanno mostrato che l'incidenza della sepsi sta aumentando nonostante l'impiego di nuovi test per la diagnosi precoce e nuove terapie. La sepsi deve essere distinta dalla SIRS la quale non è caustata da agenti infettivi ma da traumi o ischemia che provocano danni ai tessuti. La distinzione tra SIRS e sepsi è cruciale al fine di stabilire il trattamento clinico adeguato e la prognosi. Persiste la mancanza di *markers* validati da poter utilizzare per la diagnosi di sepsi, anche se biomarcatori come la procalcitonina (PCT) o il *soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1* (sTREM-1), sono spesso utilizzati per la diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi. Tuttavia permane incertezza in quanto molti casi privi di infezioni sono associati comunque ad aumentati livelli di questi biomarcatori.

Sia una risposta infiammatoria eccessiva, sia una risposta anti-infiammatoria con sviluppo di immunoparalisi, possono essere considerate la causa di una disfunzione d'organo ed eventualmente di morte. Quindi OPN e suPAR potrebbero svolgere un ruolo importante visto il loro ruolo pro-infiammatorio.

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare se i due biomarcatori, OPN e suPAR, fossero correlati tra loro; sono perciò stati dosati i livelli sierici di pazienti affetti da SIRS, ALPS e LES (tutte malattie caratterizzate da estremi livelli di infiammazione). E se fosse possibile utilizzarli come *marker* prognostici e comprenderne eventualmente i meccanismi d'azione.

Le malattie autoimmuni colpiscono circa il 5% della popolazione dei paesi occidentali. 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.

Lo scopo del secondo lavoro è stato quello di valutare gli effetti di un trattamento con un anticorpo monoclonale bloccante IL-17 in topi MRL *lpr*, modello animale dell'ALPS.



L'ALPS, è una malattia autoimmune caratterizzata da un disordine dell'omeostasi dei linfociti causato da un difetto dell'apoptosi, dall'accumulo di linfociti nella milza e nei linfonodi e da espansione clonale di linfociti T DN CD4/CD8, TCR  $\alpha\beta$  positivi.

Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che una citochina importante, coinvolta nello sviluppo dell'ALPS, è IL-17; i livelli sierici dei pazienti sono significativamente elevati rispetto a quelli dei controlli sani. Inoltre, anche topi MRL *lpr* presentano alti livelli di IL-17 prodotti in gran parte dai linfociti T doppi negativi presenti a livello dei linfonodi.

Queste osservazioni sperimentali pongono la base per il nostro studio in vivo; si andranno a valutare gli effetti sistemici di tale trattamento.

# ***MATERIALI e METODI***

## **1. PAZIENTI.**

Lo studio è stato condotto su 21 pazienti (15 affetti da ALPS e 16 da DALD); tutti diagnosticati dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino, in accordo ai criteri diagnostici indicati nella revisione del 2010 pubblicata su *Blood*. Un totale di 94 persone sane sono utilizzate come controlli.

Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Maggiore della Carità e i pazienti hanno dato consenso scritto e informato.

## **2. 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 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-Glutamina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA).

## **3. COLTURA DI PBMC.**

Per valutare la concentrazione di uPAR solubile , indotta da OPN, sono state piastrate  $1 \cdot 10^6$  cellule/ml attivati o meno con rhOPN 1 $\mu$ g/ml (R&D System, Minneapolis, MN). Dopo 6-16-24 ore, sono stati raccolti i surnatanti e dalle cellule è stato estratto l'mRNA.

## **4. DOSAGGIO DI UPAR SOLUBILE.**

La concentrazione di suPAR nel siero dei pazienti e nel surnartante di coltura cellulare, è stata misurata impiegando la metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), seguendo il protocollo fornito dal produttore (R&D). La concentrazione minima dosabile è risultata essere

di 15.65 pg/ml. Dopo aver seguito il protocollo, si è proceduto alla lettura della piastra tramite lettore ottico Spectra Count con filtro a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA). Infine, è stato utilizzato il programma I-smart per l'analisi dei dati e la costruzione della curva di regressione.

## **5. RT-PCR e REAL-TIME.**

Per gli esperimenti di Real-Time è stato isolato l'RNA totale da colture di PBMC trattati o meno con 1ug/ml di rhOPN per 6 ore e 16 ore, 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 uPAR è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA Assay No. Hs99999032\_m1). Il gene housekeeping GAPDH è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem). I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve standard.

## **6. ANALISI STATISTICHE.**

Il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato usato per l'analisi dei dati ottenuti dalle colture linfocitarie. La significatività statistica è stata attribuita per valori di  $p < 0.05$ . È stato impiegato il seguente software statistico GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

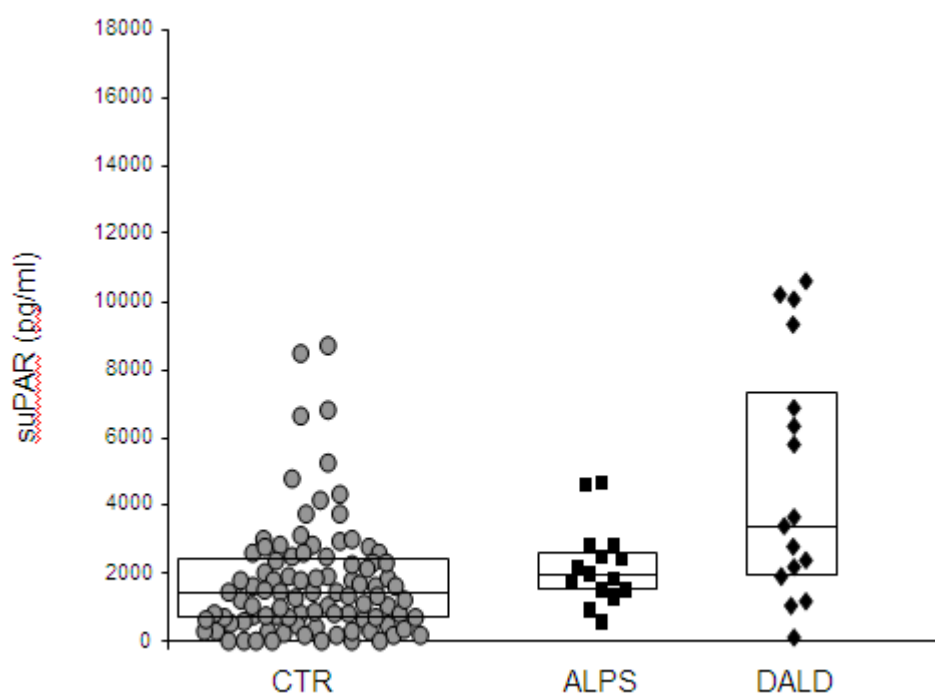
## **7. TRATTAMENTO CON ANTICORPO NEUTRALIZZANTE IL-17.**

Topi MRL lpr all'ottava settimana di vita sono stati trattati o meno con un anticorpo monoclonale anti-interleuchina 17 o con il corrispondente controllo isotipico IgG<sub>2A</sub>. Sono state effettuate quattro iniezioni intraperitoneali, con 100ug di proteina in 100ul di PBS, a distanza di quattro giorni l'una dall'altra. L'animale è stato poi sacrificato quindici giorni dopo l'ultima iniezione.

# RISULTATI

## 1. I LIVELLI SIERICI DI SUPAR SONO AUMENTATI NEI PAZIENTI CON ALPS E DALD.

Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i livelli sierici della forma solubile del recettore di plasminogeno attivato sono elevati in pazienti con SIRS. Al fine di indagare il ruolo di questa molecola nell'inflammazione sono stati dosati i livelli sierici di suPAR in pazienti ALPS, DALD e affetti da LES (malattie caratterizzate da una disfunzione del sistema immunitario) tramite saggio ELISA. Sono stati presi in considerazione 31 pazienti affetti da ALPS o DALD, rispettivamente 15 e 16 soggetti, che hanno mostrato livelli sierici di suPAR significativamente più elevati (ALPS mediana 1985 pg/ml, DALD mediana 3427 pg/ml) rispetto ai controlli sani (mediana 1449 pg/ml;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 1**).



**Figura 1. Livelli sierici di suPAR.** Livelli sierici di uPAR solubile nei controlli sani (cerchi) e nei pazienti con ALPS (quadrati) o con DALD (rombi). Il box rappresenta la mediana e il 25° e il 75° percentile.  $p < 0,05$ , test di Wilcoxon

In collaborazione con il reparto di Nefrologia di Novara, come accennato in precedenza sono stati dosati anche i livelli sierici della forma solubile di uPAR nei pazienti affetti da LES. Non viene riportato qui il grafico corrispondente. Riporto i risultati relativi alla concentrazioni sieriche di suPAR ottenuti qui di seguito: controlli sani mediana 1786,8

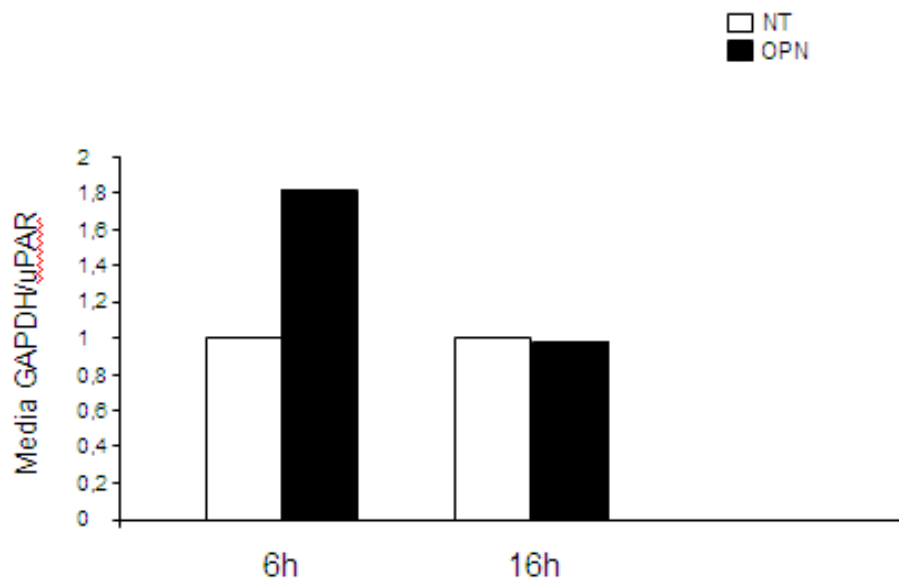
pg/ml; 25° percentile 778,4pg/ml e il 75° 2745,7pg/ml; pazienti LES mediana 4385,4 pg/ml; 25° percentile 2343,5pg/ml e il 75° 7096,1 pg/ml.

## **2. OSTEOPONTINA E' COINVOLTA NEL MECCANISMO DI REGOLAZIONE DI UPAR.**

Visti i risultati ottenuti nel nostro laboratorio, in collaborazione con il reparto di RIA di Novara, che mostrano una correlazione tra i livelli sierici di OPN e di suPAR nei pazienti affetti da SIRS, si è voluto studiare in vitro se il meccanismo di regolazione del recettore uPAR sia effettivamente dipendente da osteopontina, indagandone i ruoli funzionali. Questa ipotesi è anche supportata da ulteriori studi che mostrano il coinvolgimento della citochina OPN nel sistema uPA / uPAR. A questo scopo, sono stati valutati gli effetti di rhOPN (citochina commerciale R&D) sulla regolazione di uPAR in vitro: è stato effettuato un saggio in cui PBMC, isolati dal sangue di soggetti sani, vengono stimolati in presenza/assenza di rhOPN; l'espressione di uPAR in membrana, dell'mRNA ed i livelli della forma solubile sono stati valutati in tempi differenti.

### **2.1 OPN REGOLA L'ESPRESSIONE A TEMPI BREVI DELL'RNA MESSAGGERO DI UPAR**

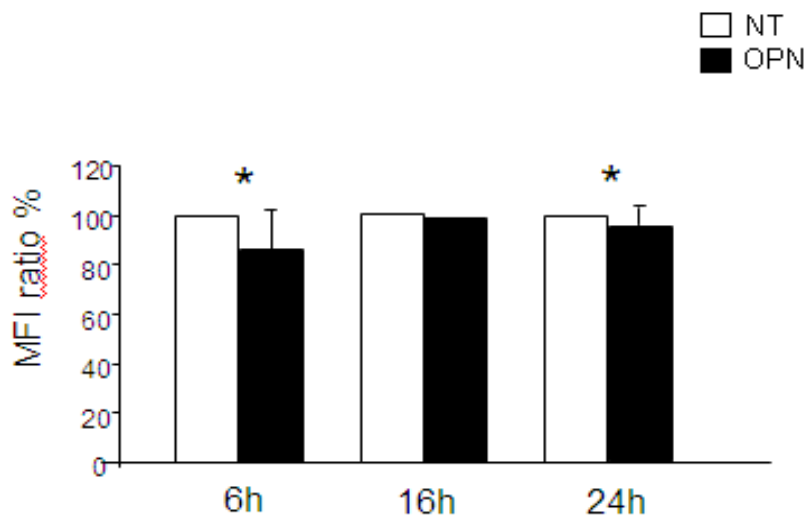
E' stata valutata l'espressione dell'mRNA a 6h e 16h dalla stimolazione. Dopo aver estratto l'RNA da PBMC (stimolati in presenza/assenza di rhOPN), è stato retrotrascritto ed utilizzato per una PCR quantitativa: è stata utilizzata una sonda anti-uPAR ed una anti-GAPDH per il gene endogeno. I livelli trascrizionali di uPAR in Real-time PCR hanno mostrato una regolazione precoce indotta da OPN. Un aumento significativo indotto da OPN nell'espressione dell'mRNA di uPAR si nota a 6 ore dalla stimolazione per annullarsi con il trascorrere del tempo: a 16 h i livelli trascrizionali ritornano paragonabili al campione non trattato. **Figura 3.**



**Figura 3. OPN induce l'espressione dell'mRNA di uPAR.** Il livello di mRNA del recettore uPAR sono aumentati a 6h dalla stimolazione con OPN. I valori relativi all'mRNA di uPAR sono stati normalizzati a quelli del gene della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e i risultati sono espressi come aumento relativo rispetto ai livelli delle cellule non trattate.

## 2.2 OPN RIDUCE I LIVELLI DI ESPRESSIONE IN MEMBRANA DEL RECETTORE UPAR

Visti i risultati ottenuti dosando i livelli sierici di suPAR nei pazienti SIRS e LES è stata supposta una correlazione diretta tra OPN e uPAR. Sono perciò stati valutati i livelli di espressione del recettore uPAR in membrana tramite citofluorimetria: si utilizza un mAb anti-CD87 (uPAR) marcato PE. I risultati mostrano che già a 6 ore dalla stimolazione con rhOPN è stata rilevata una riduzione significativa dell'espressione del recettore uPAR (i valori sono stati normalizzati al 100% per il campione non trattato; a 6h stimolati con rhOPN MFI ratio 86% , \*p = 0.03). Anche a 24 ore è stata osservata una riduzione in membrana anche se minore rispetto alle 6 ore (campione non trattato MFI ratio 100% vs stimolato MFI ratio 94.5%, \*p = 0.03). **Figura 4.**

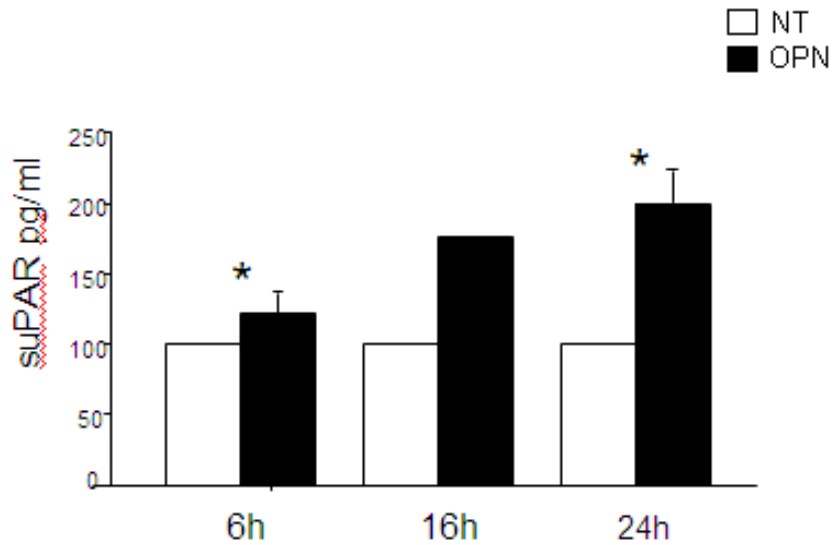


*Figura 4. OPN riduce l'espressione in membrana del recettore uPAR. L'espressione di uPAR è diminuita dopo le prime 6 ore di trattamento con rhOPN. I valori sono espressi come MFI ratio% e normalizzati al 100% per il campione non trattato. \* $p < 0.05$ , test di Wilcoxon*

### **2.3 OPN AUMENTA I LIVELLI DELLA FORMA SOLUBILE DI UPAR**

In studi sul meccanismo di regolazione di uPAR è stato dimostrato che il clivaggio proteolitico del recettore, che prevede l'eliminazione dell'ancora GPI con il conseguente rilascio della forma solubile, è necessario down-regolare il recettore stesso.

Quindi visti i dati ottenuti con gli studi in vitro in cui PBMC dopo essere stati stimolati con rhOPN mostrano una diminuzione dell'espressione del recettore in membrana, si è ipotizzato che il meccanismo di down-regolazione portasse ad un incremento della forma solubile suPAR. E' stata così dosata la concentrazione di uPAR solubile nel surnatante delle colture cellulari, stimolate o meno con la citochina. E' stato osservato un incremento dose dipendente di suPAR; già a 6 ore l'aumento è significativo nei campioni trattati con rhOPN rispetto al non trattato. Il picco massimo di concentrazione è stato osservato a 24 ore NT mediana 417pg/ml vs stimolato con rhOPN mediana 891pg/ml. I valori ottenuti a 6 e 24 ore sono statisticamente significativi  $p < 0.008$ . **Figura 5.**



*Figura 5. OPN induce il clivaggio di uPAR in PBMC. Il rilascio della forma solubile di uPAR è indotta da rhOPN in maniera dose dipendente già dopo 6 ore di trattamento). I valori del campione non trattato sono stati normalizzati a 100 pg/ml. E' stata espressa media $\pm$ Dev. St., \*p value <0,0008, test di Wilcoxon.*

### **3. IL17 SVOLGE UN RUOLO IMPORTANTE NELLO SVILUPPO DELLA MALATTIA IN TOPI LPR**

Nel nostro laboratorio è già stato dimostrato che pazienti ALPS e DALD hanno elevati livelli sierici di IL-17 rispetto a controlli sani ( $p < 0.05$ ); suggerendo che questa citochina svolge un ruolo importante nel contribuire al difetto apoptotico tipico dei pazienti ALPS/DALD.

Si ipotizza che neutralizzando IL17 si potrebbe migliorare lo stato di malattia aumentando la responsività a Fas. Per tale ragione è stato effettuato uno studio in vivo su topi MRL $lpr/lpr$ , modello animale dell'ALPS. Topi all'ottava settimana di vita, età in cui sviluppano i primi segni evidenti della malattia, sono stati trattati per 2 settimane (precisamente 4 iniezioni intraperitoneali di 100ug di proteina ogni 4 giorni) o con un anticorpo neutralizzante la citochina IL-17 o con il controllo isotipico IgG $_{2A}$ .

#### **3.1 IL TRATTAMENTO CON ANTI-IL17 RIDUCE IL VOLUME DEGLI ORGANI LINFATICI SECONDARI**

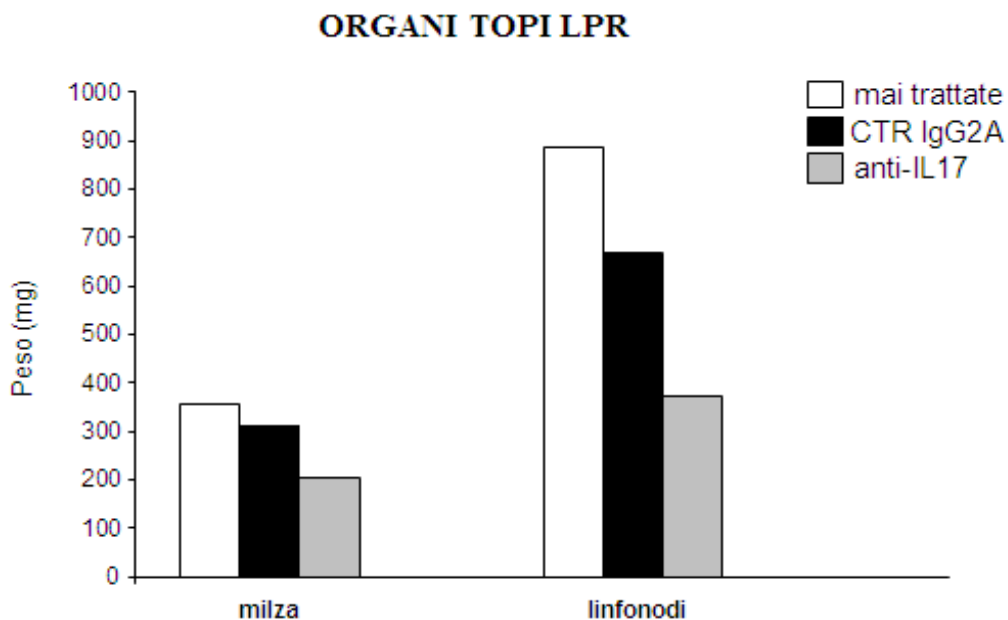
Topi trattati con un anticorpo neutralizzante anti-IL17 o con un controllo isotipico specifico sono stati soppressi dopo 15 giorni dall'ultima iniezione. Dopo aver prelevato tutto il sangue l'animale è stato sacrificato. I linfonodi superficiali cervicali, quelli ascellari e la milza sono stati recuperati; gli organi sono così stati pesati e misurati. Nel grafico sottostante vengono



inserirli anche i valori di peso in mg di milza e linfonodi di topi mai trattati, allevati nelle stesse condizioni di quelli sottoposti al trattamento e soprattutto aventi le stesse settimane di vita. Le milze ed i linfonodi dei topi trattati con l'anti-IL17 sono effettivamente di volume minore (milze: media peso 203,03mg; linfonodi: media peso 371mg) sia rispetto a quelli dei topi non trattati (milze NT 357,33mg; linfonodi 883,33mg) che iniettati con il controllo IgG<sub>2A</sub> (milze: media peso 311,67mg; linfonodi 670mg). **Figura 6b.** Alle milze sono state fatte anche delle fotografie dalle quali si può notare già a occhio la riduzione di dimensioni tra quelle del topo trattato con il controllo (lunghezza 2,6cm) rispetto a quelli in cui è stato somministrato il mAb neutralizzante (lunghezza 2cm). **Figura 6a.**



a.



b.

**Figura 6.** Il trattamento con anti-IL17 induce una riduzione del volume degli organi in topi lpr. Sono stati trattati animali all'ottava settimana di vita con un mAb neutralizzante tramite 4 iniezioni intraperitoneali, 15 giorni dopo l'ultimo trattamento sono stati prelevati gli organi linfatici secondari. **a.** Fotografia rappresentante le milze di un topo trattato con il controllo isotipico (sopra) e di un topo trattato con l'anti-IL17 (sotto); righello necessario per determinarne la lunghezza. **b.** Grafico in cui sono state riportate le medie del peso delle milza e dei linfonodi di topi lpr non trattati (bianco), animali a cui è stato somministrato il controllo isotipico (nero) e trattati con anti-IL17 (grigio).

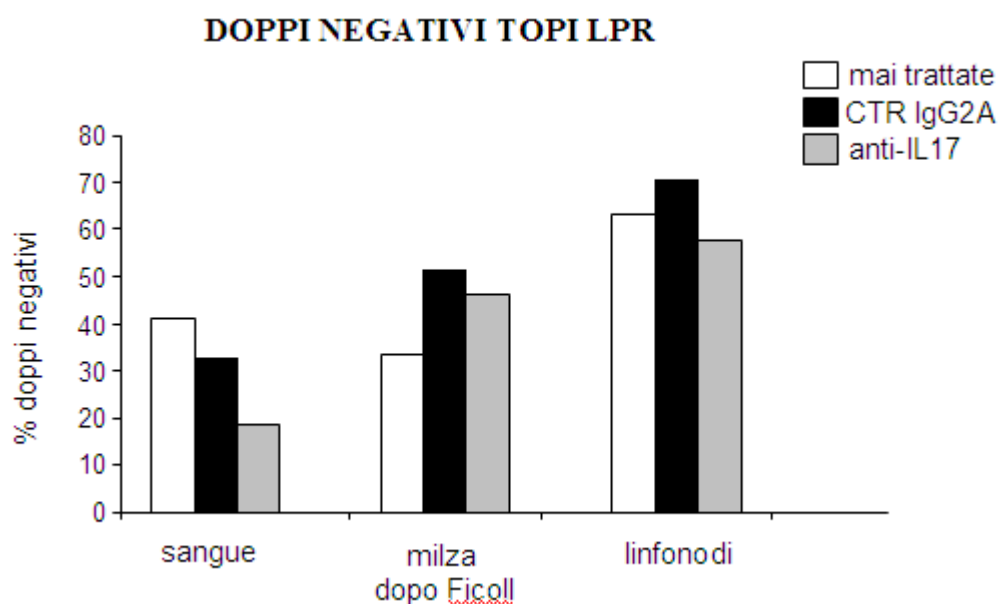
### 3.2 IL TRATTAMENTO CON ANTI-IL17 DIMINUISCE LA % DI DOPPI NEGATIVI

Studi su pazienti LES hanno dimostrato che una frazione significativa di IL-17 viene prodotta da cellule T  $\text{TCR-}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ , definiti doppi negativi (DN).

Inoltre ulteriori ricerche mostrano che nel modello animale dell'ALPS, i topi  $\text{MRLlpr/lpr}$ ,

IL-17 è la maggiore citochina prodotta dalle cellule T DN infiltrate nei reni affetti da nefrite.

Negli studi in vivo effettuati dal nostro laboratorio, gli animali sono stati soppressi alle 12 settimane di vita, dopo 15 giorni dall'ultimo trattamento che complessivamente dura 2 settimane circa. E' stata valutata la percentuale di doppi negativi nel sangue, nella milza (dopo essere stata processata con filtri da 100uM e stratificazione su Ficoll) e nei linfonodi grazie all'utilizzo di mAb marcati con fluorocromi (anti-TCR- $\alpha\beta$  PE, anti-CD4 APC e anti-CD8 FITC). In tutti gli organi considerati si nota che la percentuale del DN è minore nei topi trattati con anti-IL17 rispetto sia a quelli non trattati che a quelli trattati con l'IgG<sub>2A</sub>. La differenza maggiore si rileva nel sangue (topi non trattati %DN 41,06; topi trattati con IgG<sub>2A</sub> %DN 32,77; trattati con mAb neutralizzante %DN 18,92). **Figura 7.**



*Figura 7. Il trattamento con anti-IL17 induce una riduzione della percentuale di DN in topi lpr. La percentuale di doppi negativi viene valutata al citofluorimetro utilizzando 3 mAb specifici. Sono stati considerati topi non trattati (bianco) trattati con il controllo isotipico (nero) e trattati con anti-IL17 (grigio).*

## ***DISCUSSIONE***

La sepsi è stata definita come la presenza dello stato di SIRS accompagnato però da un'infezione accertata o anche solo presunta, rendendo difficile la distinzione tra SIRS e sepsi. Risulta perciò necessario avere a disposizione degli strumenti o dei biomarcatori per diagnosticare precocemente la sepsi e definire i pazienti ad alto rischio che necessitano di un trattamento aggressivo. Si è deciso di studiare il ruolo ed il meccanismo di regolazione di due citochine pro-infiammatorie coinvolte nell'infiammazione: OPN e suPAR.

Sono stati dosati i livelli sierici di queste due molecole, OPN e suPAR, in pazienti settici (in collaborazione con il Reparto di RIA dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara). Il nostro laboratorio aveva già dimostrato che i livelli sierici di OPN sono aumentati nei pazienti con infiammazione sistemica associata o meno ad infezione. Dopo aver dosato i livelli sierici del recettore solubile uPAR è stato dimostrato che i pazienti considerati mostrano avere elevati livelli della molecola suPAR, rispetto sempre ad una popolazione di controlli sani. Effettuando una correlazione tra i due biomarcatori si è visto che i pazienti mostrano avere elevati livelli di OPN con un aumento anormale nei tre giorni successivi di suPAR, prima di sviluppare lo shock settico. È stato così deciso di andare ad indagare il meccanismo di regolazione reciproco esistente tra le due molecole d'interesse. Questo lavoro, suggerisce che il dosaggio di OPN potrebbe essere un valido strumento diagnostico per discriminare un rischio di shock settico e che OPN e suPAR possano svolgere un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione sistemica.

Studi recenti hanno dimostrato l'importanza di IL-17 prodotta da differenti tipi cellulari: cellule T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e  $CD3^+CD4^-CD8^-$ . Contemporaneamente Yang *et al.* hanno rilevato un'associazione tra IL-17 prodotta dalle cellule T e le evidenze cliniche e di sviluppo della malattia che caratterizzano il lupus eritematoso sistemico (LES).

Il nostro laboratorio ha così deciso di valutare se IL-17 fosse coinvolta nei meccanismi patogenetici dell'ALPS. I livelli della citochina sono perciò stati dosati nel siero dei pazienti, questo ha permesso di dimostrare come IL-17 sia coinvolta nello sviluppo dell'ALPS e come questo possa peggiorare il quadro clinico inducendo un'over-espressione dell'interleuchina, creando così un ambiente citochinico che inibisce in maniera significativa l'apoptosi mediata da Fas e che favorisce l'autoimmunità. Questi dati hanno suggerito la possibilità di

somministrare in vivo un anticorpo neutralizzante IL-17 al fine di inibirne gli effetti. A supporto di tala decisione si aggiunge un lavoro di ricerca in cui topi affetti da Encefalomietite autoimmune sperimentale (EAE) se trattati con un anticorpo anti-IL17 migliorano il decorso della malattia.

Sono stati perciò trattati topi MRL/lpr, modello animale dell'ALPS e si sono andati a valutare gli effetti sistemici. I dati preliminari ottenuti hanno mostrato che effettivamente il trattamento inibisce lo sviluppo della linfoproliferazione massiva, riducendo in modo significativo la percentuale di doppi negativi presenti nel sangue e negli organi linfatici secondari.

## ***PROSPETTIVE FUTURE***

Per quanto riguarda gli esperimenti relativi allo studio del meccanismo di regolazione di uPAR mediato da OPN sono stati ripetuti gli stessi saggi in vitro, presentati in questa tesi, in cui però è stato aggiunto come stimolo oltre a rhOPN anche un anticorpo neutralizzante la citochina stessa per valutare se effettivamente i risultati ottenuti dipendono da OPN. Non sono però stati qui riportati perché sono ancora in corso di analisi.

Per quel che riguarda gli esperimenti in vivo invece sono già in corso nuovi studi per poter così ampliare la casistica.

## ***BIBLIOGRAFIA***

1. Slot O, Brünner N, Locht H, Oxholm P, Stephens RW. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma of patients with inflammatory rheumatic disorders: increased concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:488-92.
2. Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost* 2005;93:192-8.
3. Møller LB, Ploug M, Blasi F. Structural requirements for glycosyl-phosphatidylinositol-anchor attachment in the cellular receptor for urokinase plasminogen activator. *Eur J Biochem* 1992;208:493-500.
4. Casey JR, Petranka JG, Kottra J, et al. The structure of the urokinase-type plasminogen activator gene. *Blood* 1994;84:1151-56.
5. Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997;15:398-408.
6. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Rev* 2002;3:932-43.
7. Børre F, Eugen-Olsen J, Yndestad a, Brosstad F, Beiske K, et al. Enhanced levels of urokinase plasminogen activator and its soluble receptor in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2009;131:438-46.
8. Chavakis T, Willuweit AK, Lupu F, Preissner KT, Kanse SM. Release of soluble urokinase receptor from vascular cells. *Thromb Haemost* 2001;86:686-93.
9. Trigwell S, Wood L, Jones P. Soluble urokinase receptor promotes cell adhesion and requires Tyrosine-92 for activation of p56/59<sup>hck</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:440-46.
10. Garcia-Monco Jc, Coleman JL, Beach JL. Soluble urokinase receptor (uPAR, CD87) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases. *J Neuroimmunol* 2002;129:216-23.

11. Muntuori N, Carriero MV, Salzano S, et al. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem* 2002;277:46932-9.
12. May AE, Kanse SM, Lund LR, et al. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 1998;188:1029-37.
13. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Sanson E, Duckers H, Andreas H, et al. Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor is stably elevated during the first week of treatment in the intensive care unit and predicts mortality in critically ill patients. *Crit Care* 2011 Feb;16;15(1):R63.
14. Eugen-Olsen J. suPAR-a future risk marker in bacteremia. *J Intern Med* 2011 Jul;270(1):29-31.
15. Rabna P, Andersen A, Wejse C, Oliveira I, Gomes VF, Haaland MB et al. High mortality risk among individuals assumed to be TB-negative can be predicted using a simple test. *Trop Med Int Health* 2009;14(9):986-94.
16. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *TRENDS in Immunol* 2004;25(8):450-5.
17. Wittenhagen P, Kronborg G, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, Olsen Eugen J. the plasma level of soluble urokinase receptor is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia and predicts mortality. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(5):409-15.
18. Huttunen R, Surjänen J, Vuento R, et al. Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteremia: a prospective cohort study. *J Intern Med* 2011 Jul;270(1):32-40.
19. Kofoed K, Andersen O, Kronborg g, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, Larsen K. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Critical Care* 2007;11(2):R38
20. Denhard DT. , Noda M., O'Regan AW., Pavlin D. and Berman J. S. 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.

21. Mazzali M., Kipari T., Ophascharoensuk V., Wesson J.A., Johnson R. and Hughes J. Osteopontin: a molecule for all seasons. *Q. J. Med.*, 2002;95:3-13.
22. Naldini A, Leali D., Pucci A., Morena E., Carraro F., Nico B., Ribatti D. and Presta M. Cutting edge: IL1 $\beta$  mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *The Journal of Immunology* 2006;177,4267-4270.
23. 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.
24. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone-remodelling. *Exp Oncol.* 2004;26:179-84.
25. 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.
26. Mitsiades N., Wei-hsuan Yu, Poulaki V., Tsokos M. and I. Stamenkovic Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drugs cytotoxicity. *Cancer Reserch*, 2001;61:577-581.
27. Ashkar S., Weber GF., Panoutsakopoulou V., Sanchirico ME., Jansson M., Zawaideh S., Rittling S., Denhardt, DT., Glimcher MJ. and Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 2000; 287: 860-864.
28. 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.
29. 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.
30. Lin YH. and HF. 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.



31. Hashimoto MD., Sun SR., Rittling DT., Denhardt DT. and Young W. 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.
32. Hur EM., Youssef S., Haws ME., Zhang SY., Sobel R.A and Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology*, 2007;8:74-83.
33. Stromnes IM. and Goverman JM. Osteopontin-induced survival of T cells. *Nature Immunology*, 2007, 8:19-20.
34. Guo HQ., Cai R., Schroder A. and Kuo PC. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages *The Journal of Immunology*; 2001;166:1079-1086.
35. 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.
36. Xanthou G., Alissafi T., Semitekoulou M., Simoes DCM., Economidou E., Gaga M., Lambrecht BN., Llyod CM. and Panoutsakopoulou V. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subset. *Nature Medicine*, 2007.
37. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Ye SL. Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma invasion by un-regulating MMP-2 and uPA expression. *Mol Biol Rep* 2010 Aug;38(6):3671-7.
38. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: it's role in regulation of cell motility and Nuclear Factor  $\kappa$ B-mediated Urokinase Type Plasminogen Activator expression. *IUBMB Life* 2005;57(6):441-447.
39. 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.
40. Canale VC. And Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr*. 1967;70:891-899.

41. Straus SE., Sneller M., Lenardo M J., Puck JM. and Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:591-601.
42. Bleesing JJH., Brown MR., Straus SE., Dale JK, Siegel RM., Jonhson M., Lenardo MJ., Puck JM. and Fleisher TA., Immunophenotypic profiles in family with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001,98:2466-2473.
43. Lopatin U., Williams RK., Bleesing JJH., Dale JK., Wong D., Feldstein JT., Fritz S., Morrow MR., Fuss I., Sneller MC., Raffeld M., Fleisher TA., Puck JM., Strober W., Jaffe ES. and Straus SSE. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood*, 2001,97:3161-3170.
44. 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.
45. Campagnoli MF., Garbarini L., Quarello P., Garelli E., Carando A., Baravalle V., Doria A., Biava A., Chiocchetti A., Rosolen A., Dufur C., Dianzani U. and Ramenghi U. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 2006;91:538-541.
46. Martin DA., Zheng L., Siegel RM., Huang B., Fisher GH, Wang J., Jackson CE., Puck JM., Dale J., Straus SE., Peter ME., Krammer PH., Fesik S. and Lenardo MJ. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia *PNAS*; 1999,96: 4552-4557.
47. van den Berg A., Maggio E., Diepstra A, de Jong J., van Krieken D. and Poppema S. Germline Fas gene mutation in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2002;99:1492-1494.
48. 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.
49. 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.

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

## ELENCO DEI SEMINARI FREQUENTATI AA 2010-2011

1. *"Biom mineralization and preparation of biomimetic nanoapatites"*, tenuto dal Dott. Jaime Gómez Morales (Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra CSIC/Universidad de Granada Granada, Spain);  
*"Characterization of biomimetic nanoapatites"*, tenuto dal Dott. Jose Manuel Delgado (Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra CSIC/Universidad de Granada Granada, Spain); 11 Novembre 2010
2. *"Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio"*, tenuto dal Dott. Lorenzo Moretta (Università di Genova); 29 Novembre 2010
3. *"Targeting lactate-fueled respiration in cancer: a new therapeutic opportunity?"*, tenuto dal Prof. Pierre Sonveaux (Irec, Pole of Pharmacology and Therapeutics University of Louvain (UCL) Medical School Bruxelles; 01 Dicembre 2010
4. *"Bone and DDS: development of bioactive artificial bone with drug delivery ability"*, tenuto dal Prof. Makoto Otsuka (Musashino University Research Institute of Pharmaceutical Sciences - Tokyo); 27 Gennaio 2011
5. *"DNA-complex releasing system by apatitic cement for gene therapy"*, tenuto dal Prof. Tomoko Ito (Musashino University Research Institute of Pharmaceutical Sciences - Tokyo); 28 Gennaio 2011
6. 3 seminari su argomenti immunologici tenuti dalle specializzande in pediatria; 01 Marzo 2011
  - 1- *"Immunità ed immunopatologia in risposta ad infezioni virali"* (dott.sse Giacomina e Lonati - Pediatria)
  - 2- *"Il cromosoma X nelle funzioni immunitarie"* (dott.sse Di Dio e Dondi - Pediatria)
  - 3- *"Mastociti: fisiologia e patologia"* (dott.sse Bonsignori e Grassino - Pediatria)
7. *"Linfomi cutanei primitivi"*, tenuto dal Prof. Emilio Berti (Istituto di Dermatologia, Università degli studi Milano- Bicocca); 02 Marzo 2011
8. *"Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features"*, tenuto dalla Dr.ssa Sonia Levi (Associate Professor of Biology Vita-Salute San Raffaele University & Head, Proteomic of Iron Metabolism Unit Division of Neuroscience San Raffaele Scientific Institute Milano, Italia); 12 Aprile 2011
9. *"Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view"*, tenuto dalla Dr.ssa Elisabetta Bugianesi (Università di Torino, Italia); 13 Aprile 2011
10. *"Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that"*, tenuto dal Dr. Valerio Nobili,(Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma); 29 Aprile 2011
11. *"Reverse vaccination in autoimmune diseases"*, tenuto dal Dr. Gilberto Filaci (Università di Genova); 03 Maggio 2011
12. *"Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles"*, tenuto dal Dr. Henrik Wolff (Finnish Institute of Occupational Health); 09 Maggio 2011

13. *"Farmacologia dell'aterosclerosi"*, tenuto dal Dr. Alberto Corsini; 13 Maggio 2011
14. *"Celiachia: vecchie conoscenze e novità dalla ricerca"*, IRCAD; 21 Maggio 2011
15. *"Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease"*, tenuto dal Prof. Mauro Fasano (Laboratory of Biochemistry and Proteomics Dept. of Structural & Functional Biology Section of Human Biology University of Insubria Varese, Italy); 17 Giugno 2011
16. *"Importance of pathobiology in rheumatoid arthritis pathogenesis, disease evolution and response treatment (The PEAC Project)"*, tenuto dal Prof. Costantino Pitzalis MD PhD FRCP (Professor of Experimental Medicine and Rheumatology Director Musculoskeletal Clinical Academic Unit Barts and the London NHS Trust Head of Centre for Experimental Medicine and Rheumatology William Harvey Research Institute Barts and the London School of Medicine and Dentistry Charterhouse Square, London UK); 24 Giugno 2011
17. *"Frontotemporal Dementia: trying to solve a complex disorder"*, tenuto dal Dr Jonathan D. Rohrer (MRC Dementia Research Centre Institute of Neurology University College London Queen Square, London); 24 Giugno 2011
18. *"Management of high risk chronic lymphocytic leukemia"*, tenuto dal Prof. Thorsten Zenz (Department of Translational Oncology, National Center for Tumor Diseases (NCT) and DKFZ, Department of Internal Medicine V, University of Heidelberg); 30 Giugno 2011
19. *"Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis"*, tenuto dal Prof. Maurizio Parola (Università di Torino); 01 Luglio 2011

## **ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA**

Lezioni frontali interne al dipartimento:

1. *"Introduction to systemic degenerative diseases"* Prof. Emanuele Albano; 4/11/18 Marzo 2011
2. *"Amyotrophic latera sclerosis"* Prof. Lucia Corrado; 25 Marzo 2011
3. *"Parkinson and Alzheimer diseases"* Prof. Cristoforo Comi; 01 Aprile 2011

## **CONGRESSI FREQUENTATI**

2° Congresso Nazionale IFIACI (Federazione delle società Italiane di Immunologia, Allergologia ed Immunologia Clinica); Roma 25-28 Maggio 2011