

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



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

Relazione 3° 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-gegni 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.

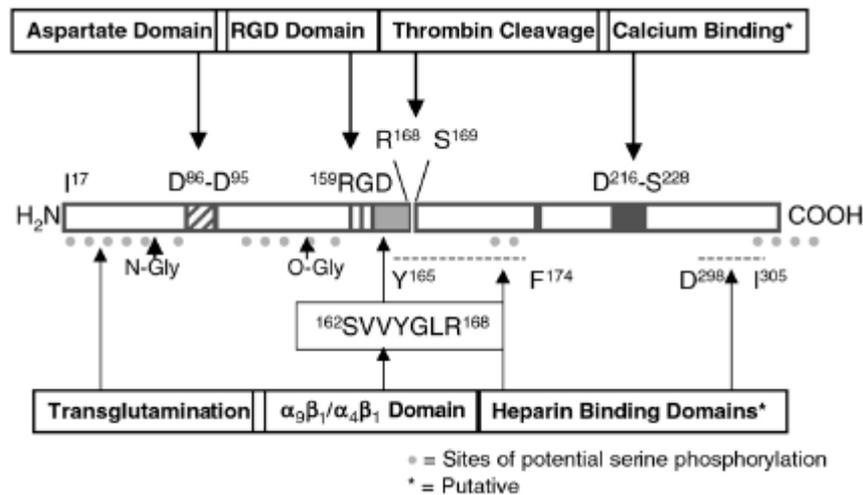
OPN è secreta principalmente dagli osteoblasti e dagli osteociti, dalle cellule epiteliali renali, dalle cellule del muscolo liscio, dalle cellule endoteliali, ma è anche abbondantemente espressa dai linfociti T e B attivati (fu identificata come *Early T-cells Activation* - Eta-1) dai monociti-macrofagi,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



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.

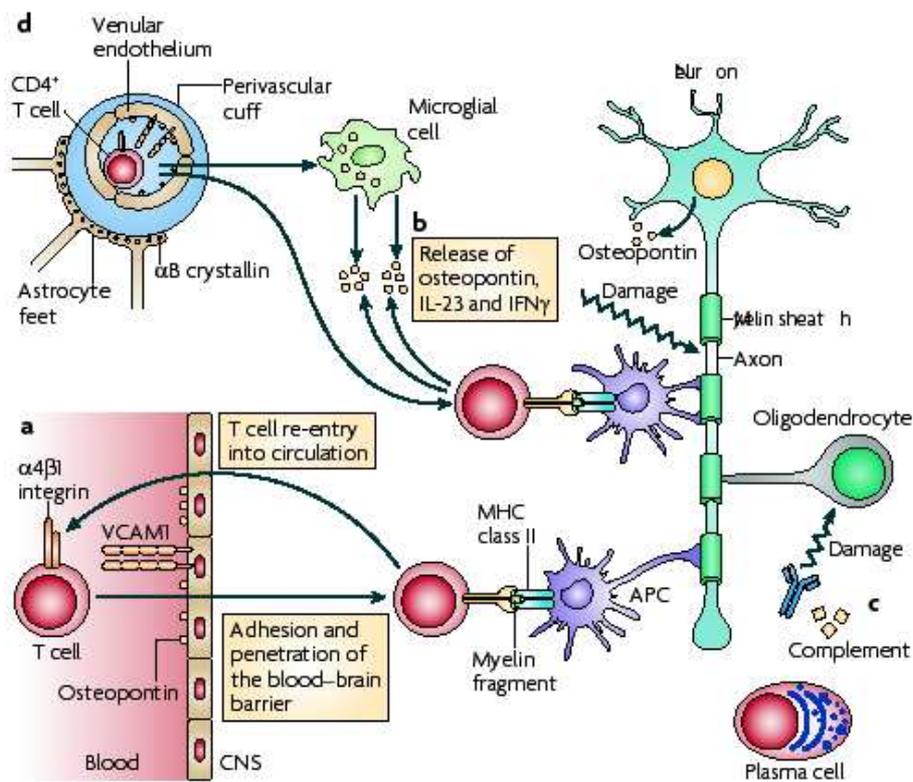
Ruolo nella Sclerosi Multipla.

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. Nella figura successiva 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.



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 $\alpha 4\beta 1$.

Come evidenziato dagli esperimenti di Chabas effettuati su modello dell'EAE [64] il ruolo patogenetico di OPN nella SM è complicato dalla presenza di auto-anticorpi diretti verso questa citochina e capaci di spegnere la risposta infiammatoria.

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 criptici 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*.

Gli esperimenti di Chabas et al. (64), nel modello murino, indirizzano verso la ricerca di auto-anticorpi diretti verso OPN in grado di migliorare il decorso della malattia. Nell'uomo, autoanticorpi contro OPN sono stati individuati solo in pazienti con AR, osteoartrite e diabete di tipo 1, ma il loro ruolo nel processo patogenetico è sconosciuto. Tuttavia, un anticorpo

neutralizzante diretto contro un epitopo criptico all'interno della porzione N-terminale di OPN sembra migliorare l'artrite nell'AR sia nel modello murino che nei primati.

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.

Inoltre questo lavoro si propone di investigare la possibilità di attuare approcci terapeutici volti ad antagonizzare gli effetti di OPN, attraverso l'identificazione e la produzione di anticorpi diretti verso ciascuna porzione della molecola che potrebbero essere usati al fine di mettere a punto un protocollo di immunizzazione passiva contro OPN.

Questo può fornire informazioni utili per la produzione di nuovi farmaci e garantire approcci terapeutici diversi.

MATERIALI E METODI

Clonaggio delle proteine ricombinati

I costrutti umani di OPN (OPNwt; OPN N-terminale e OPN C-terminale) erano già presenti nel nostro laboratorio clonati nel vettore di espressione pcDNA3.1Hygro. Il cDNA corrispondente a ciascun costrutto è stato inserito tramite PCR fuso al tag di sei istidine nel vettore pUCOE; tale vettore permette di ottenere un'espressione massiva della proteina se trasfettata in un sistema eucariotico.

La messa a punto della tecnologia di espressione UCOE (*Ubiquitous Chromatin Opening Element*) ha permesso un notevole miglioramento nell'espressione del gene in cellule di mammifero stabilmente trasfettate, dati i suoi effetti sulla struttura della cromatina; infatti questa struttura impedisce il superravvolgimento della cromatina una volta avvenuta la trascrizione della sequenza codificante la proteina, consentendo al complesso della polimerasi di interagire continuamente con la sequenza di DNA.

I primers utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti:

Per i costrutti OPNwt e OPN C-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCA**ATGGGCTGGAGC**3'

Primer reverse: OPN6xHisAscI

5'ACGT**GGCGCGCC****TTAGTGATGGT**GATGGT**GATGATTGACCTCAGAAGATGC**3'

Per il costrutto OPN N-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCA**ATGGGCTGGAGC**3'

Primer reverse: OPN His N rev

5'ACGT**GGCGCGCC****TTAGTGATGGT**GATGGT**GATGAGAACCACCACCACCCCTCAGTC**
CATAAACACAC 3'

Per i costrutti murini di OPNwt e OPN C-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCA**ATGGGCTGGAGC**3'

Primer reverse: MsOPN6xHisAscI

5'ACGT**GGCGCGCC****TTAGTGATGGT**GATGGT**GATGGTTGACCTCAGAAGATGAACTC**3'

Per il costrutto murino di OPN N-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5' ACGT**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC3'

Primer reverse: MsOPN His N rev

5' ACGT**GGCGCGCC**TTAGTGATGGTGATGGTGATGAGAACCACCACCACCCTCAGTC
CATAAGCCAAGC3'

Il primer forward presenta il sito di restrizione per l'enzima BsiWI (evidenziato in rosso) ed il primer reverse il sito di restrizione per l'enzima AscI (evidenziato in blu). In grassetto è evidenziata la sequenza codificante per le sei istidine.

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:

Per il costrutto OPN Mutata

Primer forward OPN mut Nde For

5' GGAATTCCCATATGATGGCCGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGACTGAGCTTTAAATC
TAAGAAGTTTCGC 3'

Primer reverse: OPN6xHisAscI

Per il costrutto murino di OPN Mutata

Primer forward MsOPN mut EagI For

5' CCAACCGGCCGAGGTGATAGCTTGGCTTATGGACTGAGCTTTAAGTCTAGGAGTTTC
CAG 3'

Primer reverse: MsOPN6xHisAscI

Per il clonaggio degli anticorpi anti-OPN sono stati utilizzati i primers:

Primer forward: BsiWI sense

5' acgt**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC 3'

Primer reverse: AscI anti-sense

5' acgt**GGCGCGCCTT**AAGTACTATCCAGGCCAG 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 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 µg/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), seguendo il protocollo fornito dal kit. Il DNA è stato recuperato in H₂O e quantizzato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260nm-280nm.

Prova di Tossicità

Cellule CHO-s sono state piastrate in piastra multi well da 48 pozzetti alla concentrazione di 5×10^4 in 200 µl di terreno Pro CHO5 (Lonza) in presenza di dosi crescenti di igromicinaB e incubate a 37°C in atmosfera umidificata, al 8% di CO₂. La concentrazione di igromicinaB necessaria per avere il 50% di mortalità a 48 ore di incubazione è stata fissata a 0,2mg/ml. Tale concentrazione è stata poi utilizzata per ottenere cloni trasfettati stabilmente.

Trasfezione di cellule CHO-s e produzione di cloni stabili

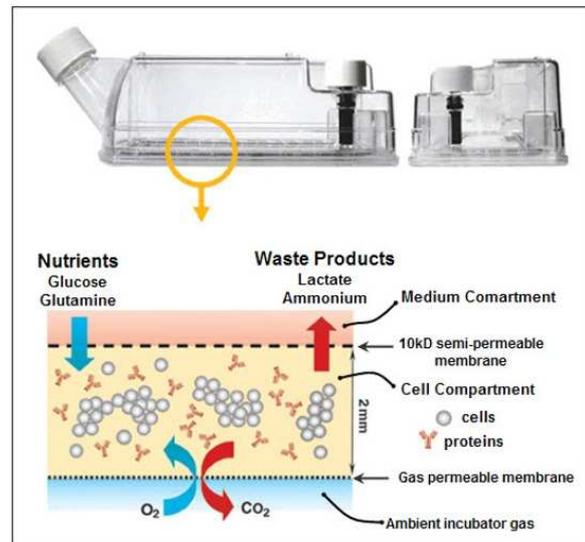
Il giorno prima della trasfezione le cellule CHO-s sono state seminate in multi well da 48 pozzetti in 1ml di terreno CHOS-SFMII (Invitrogen) alla concentrazione di $0,5 \times 10^6$ cellule /ml e incubate a 37°C in atmosfera umidificata, al 8% di CO_2 . La trasfezione è stata eseguita utilizzando il reagente FreeStyle MAX Reagent (Invitrogen), secondo le istruzioni fornite dalla ditta.

La presenza di ciascuna proteina ricombinante nel surnatante di coltura è stata verificata mediante Western Blotting dopo 72h di coltura.

Dopo aver verificato mediante Western Blotting l'avvenuta trasfezione, le cellule sono state poste in selezione con 0,2 mg/ml di igromicinaB, ovvero la quantità di antibiotico scelta nel test di citotossicità effettuato su cellule non trasfettate. Le cellule sono state espanse in terreno selettivo per 2 giorni e poi sono state contate e seminate, in terreno selettivo, in multiwell da 96 pozzetti in modo da avere 1-2 cellule/pozzetto in 200 μl di terreno. Dopo circa 3 settimane sono risultati visibili alcuni cloni cellulari, il cui surnatante di coltura è stato testato per Western Blotting per verificare la presenza della proteina ricombinante.

Coltura di cellule CHO-s

Per ottenere una elevata produzione di proteine ricombinanti con le specifiche modificazioni post-traduzionali, è richiesto l'uso di cellule di mammifero e le condizioni di crescita devono essere opportunamente controllate. A questo scopo, è stato scelto come sistema di espressione la linea CHO-s (**Chinese Hamster Ovary**), in grado di crescere in sospensione. Le cellule sono state mantenute in coltura sfruttando un sistema innovativo di coltura cellulare, con il nome di



CELLLine™ (BD Biosciences), che permette di ottenere concentrazioni di proteine ricombinanti 50-100 volte più alte rispetto al mantenimento in coltura tradizionale. Le cellule sono state coltivate in terreno specifico CHO-S-SFMII (Invitrogen) al quale sono stati aggiunti gli antibiotici, quali penicillina, streptomina e gentamicina. In ogni CELLLine™ sono state piastrate nella camera interna $1,5 \times 10^6$ cellule/ml in un volume finale di 15 ml di terreno, mentre nella parte esterna è stato aggiunto circa 1L di terreno. Le cellule si dispongono sulla membrana di silicone che permette il diretto accesso all' O_2 e all'anidride carbonica, mentre i nutrienti e le piccole molecole arrivano alla camera di coltura passando attraverso una membrana semipermeabile di acetato di cellulosa. Il

CELLLine™ è stato mantenuto a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂. Due volte a settimana sono state raccolte le cellule centrifugando a 1000 rotazioni per minuto (rpm) per 10 minuti. Il surnatante, nel quale viene secreta la proteina ricombinate di interesse è stato conservato a -20°C per essere purificata, mentre le cellule sono state eliminate e sostituite da altre fresche.

Western Blotting

Surnatanti di coltura dei cloni stabili di cellule CHO-s, sono stati raccolti e analizzati mediante Western Blot per la presenza della relativa proteina ricombinante.

I campioni ottenuti sono stati caricati su gel SDS-PAGE al 10% di acrilammide secondo protocollo standard (*Current Protocols in Molecular Biology*).

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%). La nitrocellulosa è stata saturata con una soluzione di 5% di latte in TBS-T (Tris Base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l ph 7,6 0,1% Tween-20), e quindi incubata 16 ore a 4°C con i seguenti anticorpi: Tetra-His Antibody–Qiagen diretto contro il tag di 6 istidine, SPP1 Polyclonal Antibody-Thermo Scientific- diretto contro un epitopo C-terminale di OPN, Polyclonal anti-Osteopontin Antibody-Millipore-diretto contro un epitopo di OPN N-terminale. 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

La purificazione delle proteine fuse al 6xHis tag è stata eseguita mediante cromatografia per affinità su colonna con resina al nichel Ni-NTA Resin (Qiagen) in un buffer costituito da 50mM NaH₂PO₄ pH8.0, 300mM NaCl, 10mM imidazolo. L'eluizione della proteina è stata effettuata in elution buffer (50mM NaH₂PO₄ pH8.0, 300mM NaCl, 250mM imidazolo). La proteina così purificata è stata dializzata ON contro PBS1X e quantizzata mediante densitometria su gel di Coomassie.

La purificazione degli anticorpi anti OPN è stata effettuata mediante 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.

Digestione enzimatica con trombina

5µg di rhOPN-6xHis e rhOPN Mut-6xHis sono stati sottoposti a digestione con 0,1U di Trombina (Calbiochem) mediante incubazione per 1h a 37°C in un buffer costituito da 20mM Tris HCl pH7.6, 80mM NaCl e 2mM CaCl₂. 300µg del prodotto della digestione enzimatica sono stati caricati su gel di poliacrilammide e analizzati mediante western blotting effettuato con anticorpi diretti verso la porzione N- o C-terminale di OPN o contro il tag 6xHis.

Separazione su gradiente di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC)

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-Glutamina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS.

Separazione di linfociti T CD4⁺ e monociti da PBMC

Per la purificazione dei linfociti T CD4⁺ e dei monociti è stato utilizzato un kit commerciale (Milteniy-Biotec, Germany), il quale permette di effettuare una selezione negativa purificando solo la popolazione cellulare d'interesse, sfruttando anticorpi biotinilati successivamente coniugati ad anticorpi anti-biotina, legati a biglie magnetiche. Le cellule marcate ritenute nella colonna sono state eliminate, mentre le cellule non marcate di nostro interesse sono state eluite.

La purezza delle cellule è stata valutata per mezzo di analisi immunofenotipiche ed è risultata sempre superiore al 95%.

Saggi funzionali

I linfociti T CD4⁺ e i monociti sono stati utilizzati per valutare la capacità delle proteine ricombinanti da noi prodotte di indurre la secrezione di citochine. In particolare i linfociti T CD4⁺ sono stati saggiati per la produzione di IFN-γ e IL-17, mentre i monociti per la produzione di TIMP-1. Gli effetti delle proteine ricombinanti da noi prodotte sono stati confrontati con quelli indotti dalla proteina rhOPN commerciale (R&D Systems).

I linfociti T CD4⁺ sono stati piastrati alla concentrazione di 1x10⁵ cellule/pozzetto in 100µl e in presenza di 1µg/mL di anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e di 1µg/mL di anti-CD28, precedentemente adesi alla piastra di coltura. Le cellule sono state stimulate o meno con 1 µg/ml delle molecole ricombinanti intere o di quantità equimolari delle proteine corrispondenti ai

frammenti generati dal taglio della trombina. La secrezione della citochina nel surnatante è stata valutata dopo 24h di coltura, mediante il kit ELISA Human IFN-gamma Cytokine (BioLegend, San Diego, CA,USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

Al fine di valutare la produzione di IL-17, i linfociti T CD4⁺ sono stati attivati in presenza di 1µg/mL di anti-CD3 e 1µg/mL di anti-CD28, su una piastra da 96 pozzetti a fondo tondo. Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 0,1x10⁵ cellule/pozzetto in 200 µl di terreno RPMI1640 al 10% di FBS con aggiunta di IL-6 (20 ng/ml) e IL-1β (10 ng/ml), citochine note indurre la produzione di IL-17, in presenza o meno di 1 µg/ml delle rhOPN corrispondenti alla molecola intera, o di quantità equimolari dei frammenti N- e C-terminale. Ogni condizione è stata eseguita in triplicato. I surnatanti sono stati raccolti al 5 giorno di coltura e saggiati per la produzione di IL-17 mediante il kit ELISA DuoSet IL17 (R&D Systems).

Per valutare la produzione di TIMP-1 0,1x10⁵ di monociti sono stati seminati in una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto in 100 µl di terreno RPMI 1640 + 10% di FBS in presenza o meno delle diverse forme di OPN e lasciati incubare per 48 ore. La stimolazione è stata effettuata utilizzando 1µg/ml di rhOPN e quantità equimolari dei frammenti N- e C-terminali. Al termine della stimolazione, i surnatanti delle colture sono stati raccolti e saggiati per la presenza di TIMP-1 utilizzando il kit ELISA DuoSet TIMP-1 (R&D Systems).

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 5x10⁴ 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 di quantità equimolari delle molecole ricombinanti Home-made e coltivati per 18 ore. Per gli esperimenti di inibizione della funzione di OPN la stimolazione è stata effettuata in presenza di 10µg/ml di anticorpo. 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.

Saggio ELISA

La capacità degli anticorpi anti-OPN di riconoscere la molecola ricombinante verso cui era stato selezionato è stata testata mediante un test ELISA diretto. A questo scopo 2 µg/ml della proteina rhOPN-6xHis/ rhOPN N-ter-6xHis/rhOPN C-ter-6xHis purificata sono stati adsorbiti su piastre ELISA mediante una incubazione overnight a 4°C. Ogni pozzetto è stato saturato con PBS-0,05% Tween e incubato per 1h a temperatura ambiente con ciascun minibody. Il legame è stato visualizzato mediante l'impiego di un anti-human coniugato HRP (BIO-RAD). La reazione è stata visualizzata con TMB (*Tetramethyl Benzidine*) (Sigma) e l'assorbanza letta a 450nm mediante BS1000 SpectraCount (Packard).

Analisi statistiche

Il test impiegato per paragonare i risultati ottenuti è stato il test di Wilcoxon per l'analisi dei dati appaiati. Tutti i valori assunti delle p avevano due code e il cut-off di significatività è $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state effettuate impiegando il software GraphPad InStat (San Diego, California, USA).

RISULTATI

Produzione e purificazione delle molecole ricombinanti

Allo scopo di studiare gli effetti del taglio della trombina sul ruolo patogenetico di OPN nella SM è stata prodotta sia la molecola wild-type che i due frammenti derivanti dal taglio proteolitico di OPN (N- e C-terminale) e la proteina intera mutata e quindi non digeribile da parte della trombina. Tutte le molecole sono state fuse al al tag di 6 istidine che ne ha consentito la successiva purificazione mediante cromatografia per affinità.

In particolare sono stati clonati:

- il frammento N-terminale, che si estende dall' aa 17 al 168 ed espone la sequenza 162-SVYGLR-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 utilizzata per clonare le proteine murine.

Tutte le proteine ricombinanti sono state prodotte mediante amplificazione del cDNA corrispondente con specifici oligonucleotidi e clonati in 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 nel terreno di coltura delle cellule. Dal momento che la funzione e l'antigenicità di OPN dipende in larga misura dalle modificazioni post-traduzionali della molecola, tutte le proteine ricombinanti sono state prodotte in un sistema eucariotico. In particolare è stato utilizzato il plasmide pUCOE-MB, che consente di ottenere rese elevate e costanti nel tempo della proteina ricombinante. Ciascun plasmide è stato trasfettato in cellule CHO-s e, la presenza della proteina ricombinante nel surnatante di coltura è stata verificata mediante western blotting decorato con anticorpi diretti verso OPN (mappanti nella porzione N- o C-terminale) o verso il tag di istidine.

In **figura 1A** è mostrato un Western blot dei surnatanti di coltura di cellule CHO-s trasfettate con i costrutti umani decorato con un anticorpo diretto verso il tag di istidine. Tutte le proteine ricombinanti da noi prodotte danno un segnale della taglia attesa, ovvero circa 60kDa per le

molecole corrispondenti a OPN intera, e circa 35kDa per la porzione N-terminale e 25kDa per la porzione C-terminale.

Gli stessi surnatanti sono stati inoltre valutati per la capacità di essere riconosciuti da anticorpi specifici per ciascun frammento di OPN. In particolare la **figura 1C** mostra il western blot effettuato con un anticorpo diretto verso la porzione N-terminale di OPN. Come si può vedere le proteine corrispondenti alla molecola intera, sia wild-type che mutata, e al frammento N-terminale, sono riconosciute da questo anticorpo; al contrario, nessun segnale è dato in corrispondenza del frammento C-terminale. Allo stesso modo l'anticorpo anti-OPN diretto verso un epitopo C-terminale della molecola rileva solo le proteine chimeriche rhOPN C-ter+6xHis ed rhOPN Mut+6xHis e rhOPN wild-type+6xHis che possiedono tale epitopo (**figura 1B**) mentre, come atteso, non è in grado di rilevare la molecola chimerica corrispondente al solo frammento N-terminale.

Anche le proteine ricombinanti corrispondenti a OPN murina sono state prodotte allo stesso modo e sottoposte ad analisi western blot con anticorpi specifici. Essi sono stati riconosciuti solo dall'anticorpo diretto verso le istidine e da quello diretto verso un epitopo N-terminale di OPN. Tutti quanti danno un segnale della taglia attesa, come mostrato in **figura 1D** e **1E**.

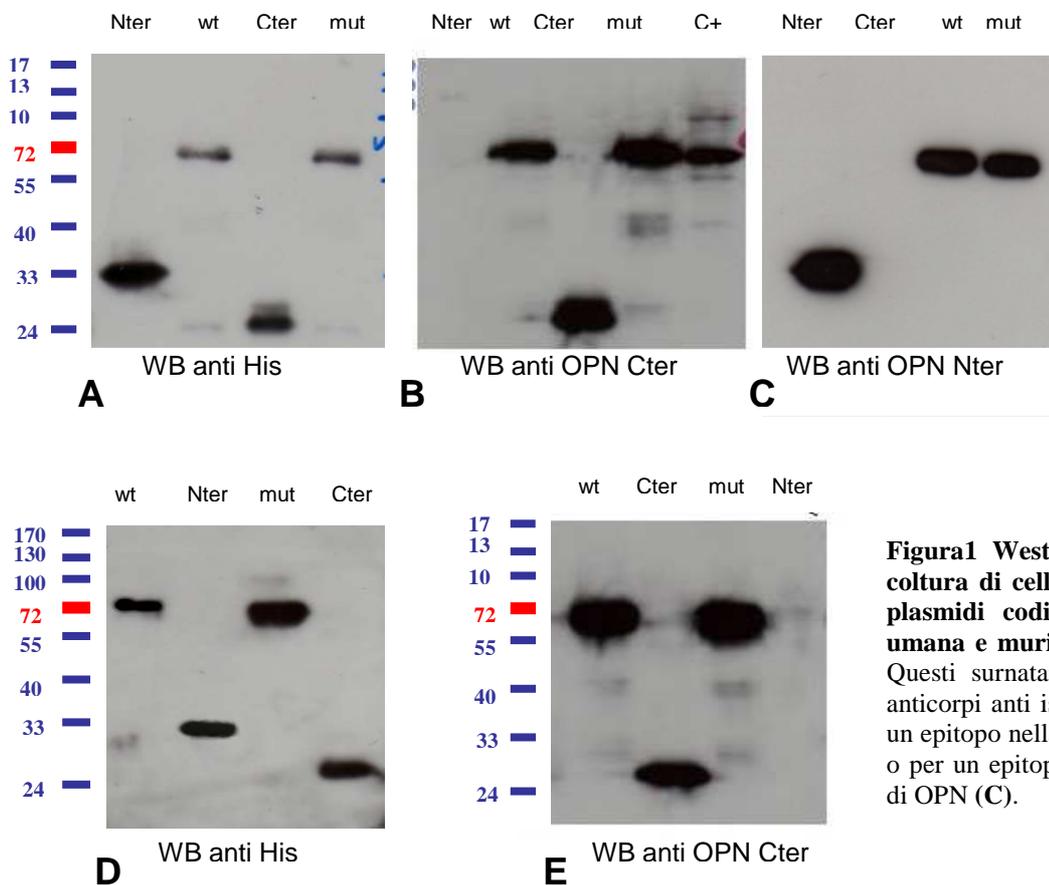
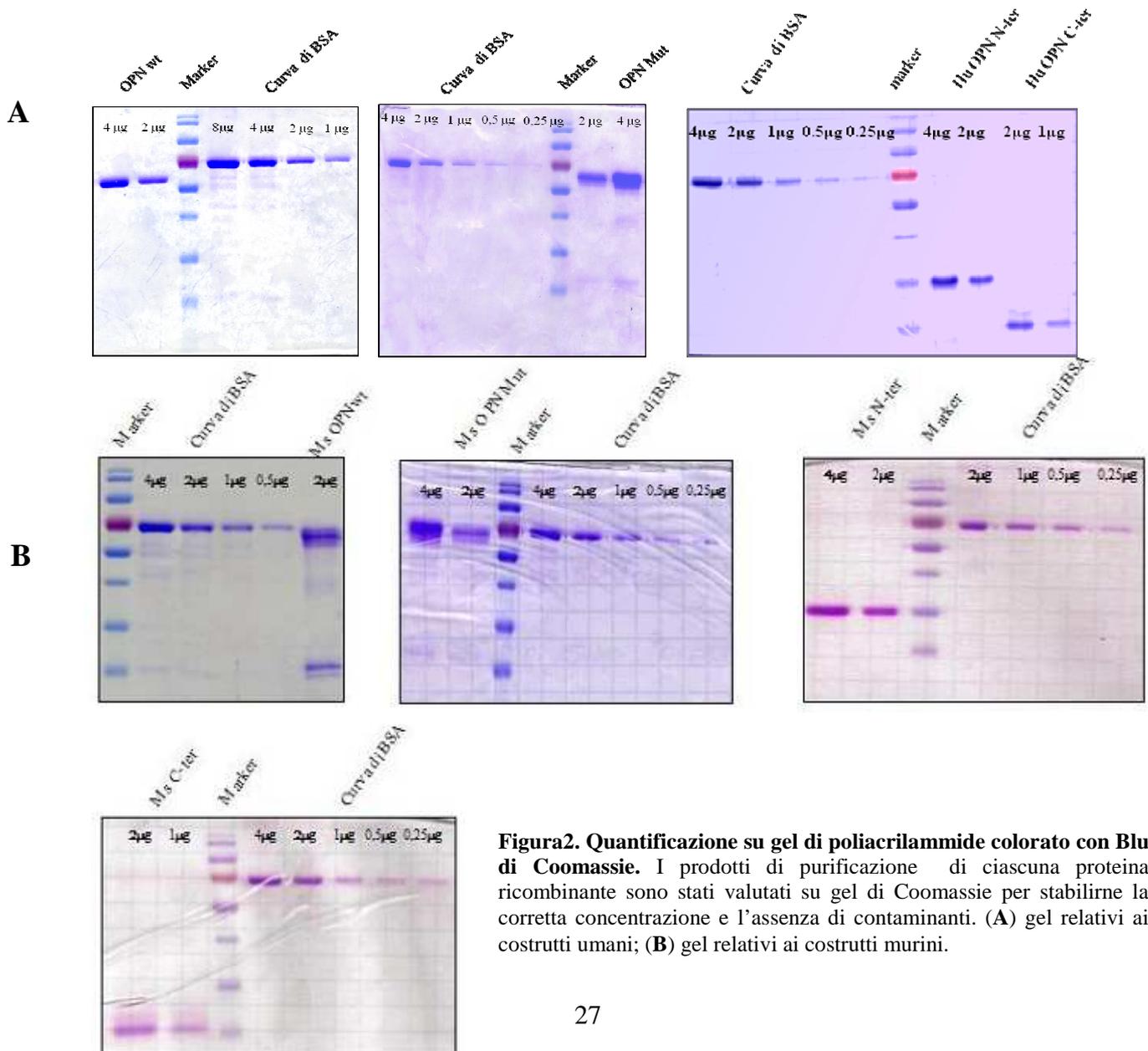


Figura1 Western Blot dei surnatanti di coltura di cellule CHO-s trasfettate con i plasmidi codificanti i mutanti di OPN umana e murina, fusi al tag di 6 istidine. Questi surnatanti sono stati analizzati con anticorpi anti istidina (**A, D**), e specifici per un epitopo nella porzione C-terminale (**B, E**) o per un epitopo della porzione N-terminale di OPN (**C**).

Le cellule trasfettate sono state poste in terreno selettivo al fine di generare cloni cellulari capaci di esprimere stabilmente ciascuna proteina ricombinante. La presenza della sequenza leader delle Ig a monte del sito di clonaggio, nel plasmide utilizzato, ha consentito di ottenere le proteine ricombinanti nel surnatante di coltura cellulare, da cui ciascuna proteina è stata purificata mediante cromatografia per affinità su colonna al Nichel. L'eluato dalla colonna è stato sottoposto a dialisi contro PBS al fine di eliminare i sali contenuti nel buffer di eluizione. La proteina purificata e dializzata 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. La **figura 2** mostra i gel di Coomassie relativi a ciascuna proteina. La colorazione con Blu di Coomassie ha consentito non solo di confermare la quantizzazione, ma anche di escludere la presenza di proteine contaminanti in ciascuna preparazione proteica.



Digestione enzimatica con Trombina

Le proteine ricombinanti di OPN intera (wild-type e mutata) sono state sottoposte a digestione con trombina, al fine di verificare se la mutazione inserita conferisse realmente alla molecola resistenza al taglio da parte di questo enzima. Il prodotto della digestione è stato caricato su gel di poliacrilammide e sottoposto ad analisi Western Blot decorato con anticorpo diretto verso il tag di istidine. Come atteso la digestione della molecola ricombinante wild-type determina una riduzione della taglia della proteina rispetto alla molecola non digerita, che corrisponde all'assenza del frammento N-terminale (**figura3**). Questo effetto non si ottiene per la proteina mutata. Pertanto la sostituzione aminoacidica inserita, che ha portato alla formazione della OPN Mutata (OPN^{R168S/S169F}), è effettivamente in grado di conferire alla molecola la capacità di resistere all'azione proteolitica della Trombina.

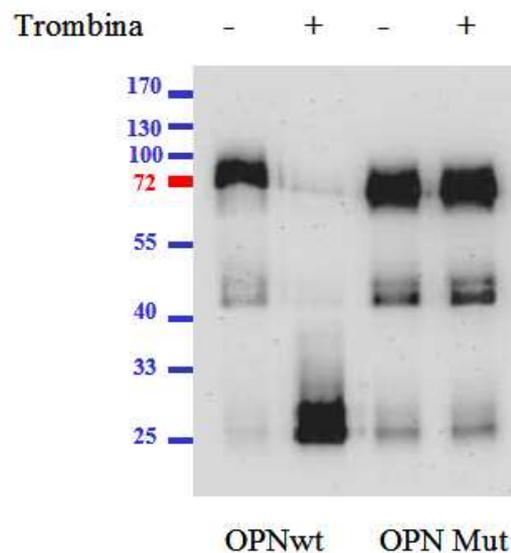


Figura3 Western Blot delle proteine OPNwt-6xHis e OPN Mut-6xHis digerite con Trombina. Il prodotto della digestione operata dalla Trombina e le proteine non digerite sono state caricate su gel di poliacrilammide e sottoposti ad analisi wester blot decorato con anticorpo diretto contro l'epitopo di 6 istidine.

Validazione della funzionalità delle proteine ricombinanti

Negli anni passati nel nostro laboratorio sono stati investigati gli effetti della somministrazione esogena di OPN sulla attivazione di PBMC e monociti, dimostrando che OPN gioca un ruolo nella produzione di IFN- γ , IL-17 e TIMP-1 e protegge i linfociti T dalla AICD (*Activation Induced Cell Death*). Questi test sono stati utilizzati al fine di validare la funzionalità delle proteine ricombinanti da noi prodotte e di studiare il ruolo di ciascuno dei due frammenti generati dal taglio della trombina.

Effetti sull'apoptosi

Il saggio di protezione dalla morte cellulare è stato utilizzato per valutare la funzionalità e gli effetti delle proteine ricombinanti umane da noi prodotte. Il tasso di mortalità è stato valutato sfruttando l'incorporazione del colorante Blu di Tripiano 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 delle proteine ricombinanti con il punto sperimentale condotto in loro assenza. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al campione non trattato e paragonati a quelli ottenuti in presenza della proteina commerciale rhOPN. I risultati mostrano che OPN wt prodotta in laboratorio è in grado di inibire in maniera significativa la morte cellulare con un effetto del tutto paragonabile a quello della molecola ricombinante commerciale. Inoltre, sia OPN mutata sia i frammenti N- e C-terminali si sono dimostrati efficaci nella protezione dalla morte dei linfociti indotta dall'attivazione (**figura4**). Da questi risultati è possibile concludere che OPN è un efficace fattore di protezione contro la morte cellulare indotta dall'attivazione e che questo effetto dipende dall'interazione con diversi ligandi riconosciuti dalle varie porzioni della molecola.

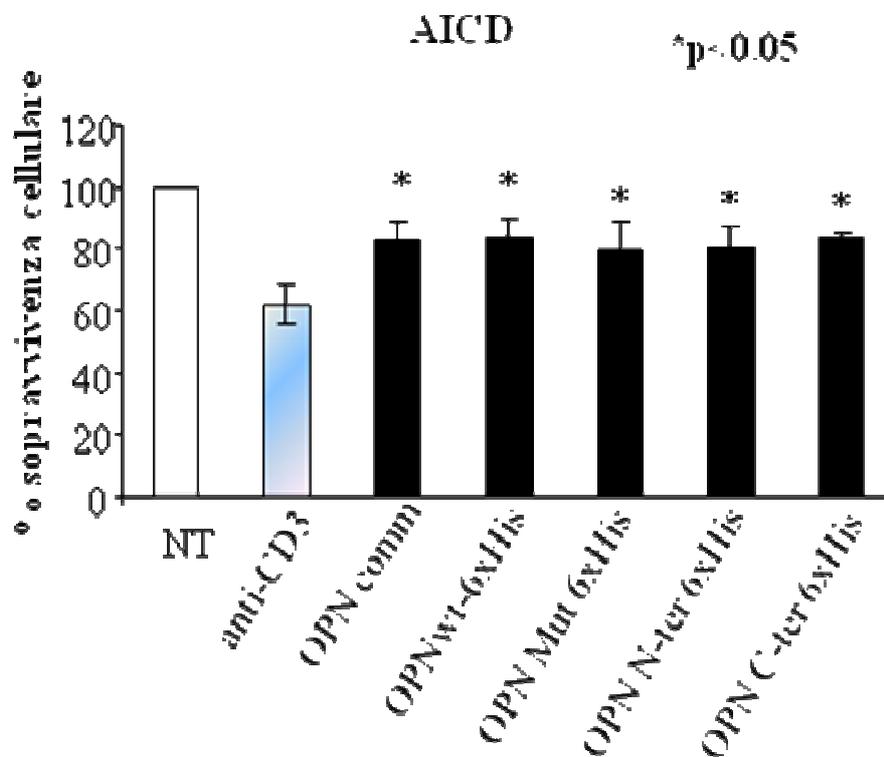


Figura4. Effetti di OPN sulla sopravvivenza dei linfociti T. I linfociti T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 µg/ml) per indurre attivazione in presenza o in assenza 1µg/ml di OPN commerciale o delle differenti forme di OPN ricombinante home made a concentrazioni equimolari. I risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare. Nel grafico sono rappresentate la media ± l'errore standard di 5 esperimenti indipendenti. *p<0,05 rispetto alla condizione con il solo anticorpo anti-CD3 utilizzando il test di Wilcoxon.

Secrezione di IFN- γ

La funzionalità delle proteine ricombinanti rhOPN home-made è stata inoltre testata per la capacità di indurre secrezione di IFN- γ da parte di linfociti T CD4⁺ attivati mediante 1 μ g/mL di anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e di 1 μ g/ml di anti-CD28. Gli effetti delle proteine ricombinanti da noi prodotte sono stati confrontati con quelli indotti dalla proteina rhOPN commerciale (R&D). I livelli di secrezione di IFN- γ da parte di linfociti T CD4⁺ in presenza di rhOPN risultano sovrapponibili a quelli indotti in presenza della proteina commerciale. Entrambi i frammenti sono risultati essere coinvolti nella secrezione di questa citochina (**figura 5**). Questi risultati sono solo preliminari e devono essere confermati su un numero maggiore di donatori.

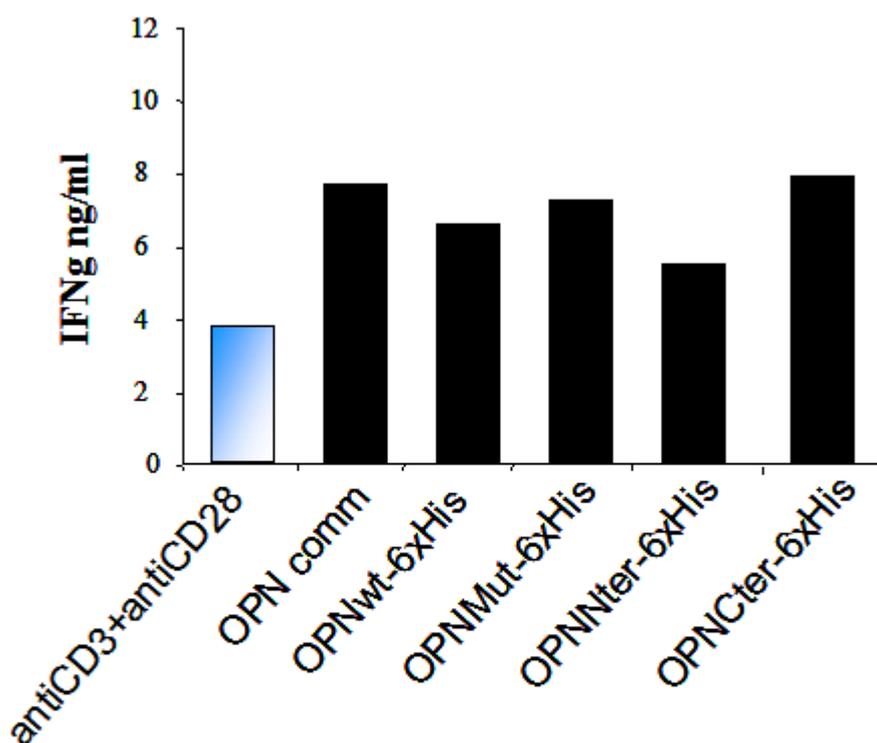


Figura5. Effetti di OPN sulla produzione di IFN-g da parte di linfociti T CD4⁺. I linfociti T CD4⁺ sono stati attivati con anti-CD3 (1 μ g/ml) e anti-CD28 (1 μ g/ml) in presenza o in assenza 1 μ g/ml di OPN commerciale o delle differenti forme di OPN ricombinante home made a concentrazioni equimolari. I risultati mostrati si riferiscono a due esperimenti indipendenti

Secrezione di IL-17

Dal momento che IL-17 è coinvolta nella progressione della SM e OPN è in grado di sostenere il fenotipo Th-17, è stato valutato quale fosse l'effetto delle nostre proteine ricombinanti sulla produzione di questa citochina da parte di linfociti T CD4⁺. Inoltre, negli anni passati il nostro laboratorio ha dimostrato che OPN aumenta il rilascio di IL-6 da parte di monociti, una citochina pro-infiammatoria che in combinazione con IL-1 β guida il differenziamento dei linfociti in senso Th-17. I linfociti CD4⁺ sono stati attivati con un anticorpo anti-CD3 e uno anti-CD28, in presenza di IL-6 e IL-1 β . IL-17 è stata dosata nei surnatanti delle colture cellulari dopo 5 giorni di stimolazione con i costrutti di OPN mediante saggio ELISA. Il basale, rappresentato dai linfociti T CD4⁺ in presenza di anti-CD3+anti-CD28, mostra un certo grado di secrezione di IL-17 se pur a livelli bassi, dimostrando l'attività intrinseca dei linfociti T di produrre la citochina in seguito ad attivazione. Si può osservare che la presenza di OPN induce e incrementa in maniera significativa la secrezione di IL-17. La molecola commerciale e le molecole Homemade OPN wt e OPN mutata, inducono simili livelli di secrezione di IL-17. Viceversa il confronto dell'effetto esercitato dalle due porzioni N- e C-terminali dimostra che OPN N-terminale è significativamente più attiva nella induzione di IL-17 rispetto alla porzione C-terminale (**figura6**). Questi dati suggeriscono che antagonisti della porzione N-terminale di OPN potrebbero essere utilizzati per inibire la secrezione di IL-17 indotta da OPN.

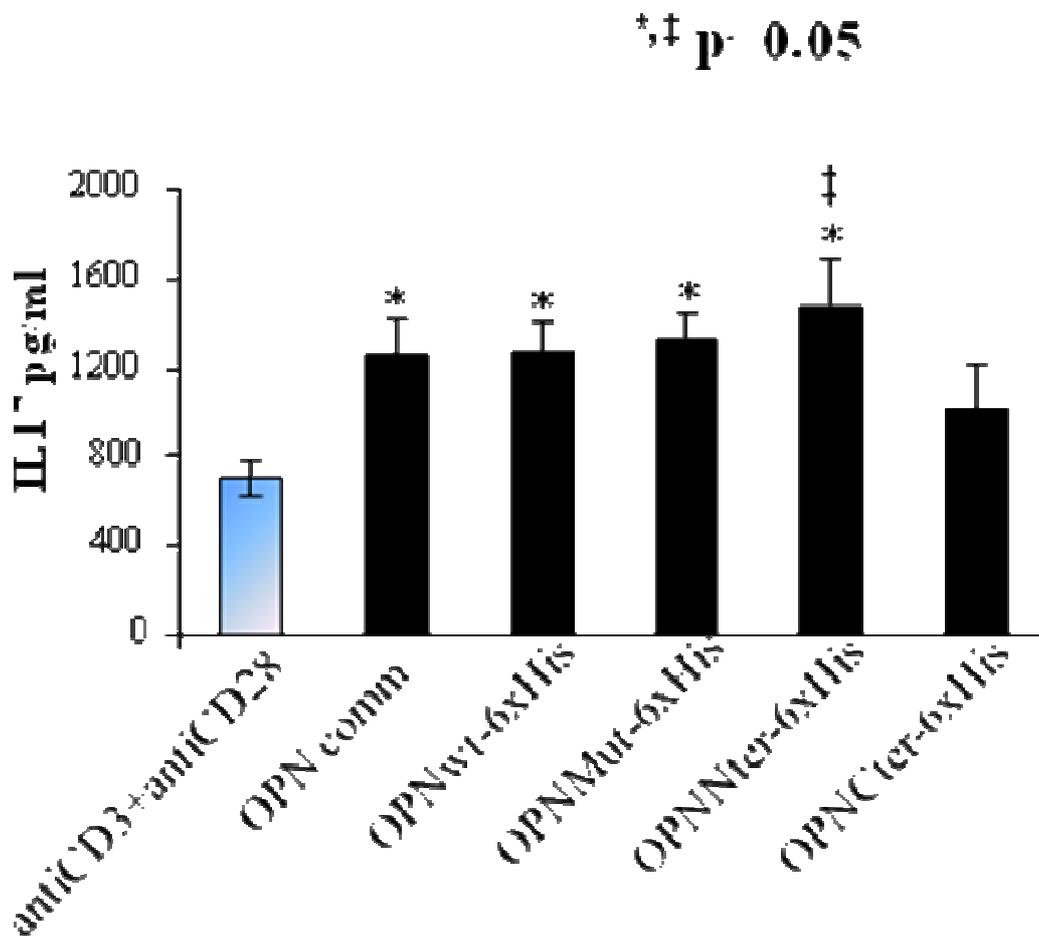


Figura6. Effetti di OPN sulla produzione di IL-17 da parte di linfociti T CD4⁺. I linfociti T CD4⁺ sono stati stimolati con anti-CD3/anti-CD28 con aggiunta di IL-6 e IL-1 β in presenza o in assenza dei diversi costrutti di OPN ricombinante con il tag 6xHis a concentrazioni equimolari: OPN commerciale (R&D System), OPN wt e OPN-Mut (1 μ g/ml); OPN N-ter e C-ter (0,5 μ g/ml). I surnatanti sono stati raccolti al quinto giorno ed è stata valutata la secrezione di IL-17 con un saggio ELISA. Nel grafico sono rappresentate la media \pm l'errore standard di 7 esperimenti indipendenti. *p<0,05 rispetto alla condizione con il solo anticorpo anti-CD3+anti-CD28; ‡ p<0,05 della condizione in presenza di OPN N-ter rispetto a quella con OPN C-ter, utilizzando il test di Wilcoxon.

Secrezione di TIMP-1

In passato è stato dimostrato che OPN è in grado di indurre secrezione di TIMP-1 da parte di monociti e che TIMP-1 inibisce, *in vitro*, sia l'AICD che la morte indotta da Fas dei linfociti T. Pertanto è stata studiata anche l'interazione funzionale tra OPN e TIMP-1, due molecole coinvolte nella risposta infiammatoria e nella patogenesi della SM. In particolare è stato valutato l'effetto dei diversi costrutti di OPN sull'espressione di TIMP-1 da parte di monociti *in vitro*. La valutazione della secrezione della proteina ha dimostrato che la popolazione dei monociti, in assenza di qualsiasi stimolo, è in grado di secernere TIMP-1 dopo 48 ore di coltura. Tutte le proteine ricombinanti sono state testate per la capacità di indurre secrezione di TIMP-1 da parte di monociti purificati da sangue periferico di donatori sani, e i loro effetti sono stati paragonati a quelli determinati dalla stimolazione con la rhOPN commerciale. La porzione N-terminale risulta avere un effetto minore, anche se significativo (**figura7**). Questi dati suggeriscono che antagonisti di OPN e in particolare della porzione C-terminale potrebbero essere utilizzati per inibire la secrezione di TIMP-1 indotta da OPN.

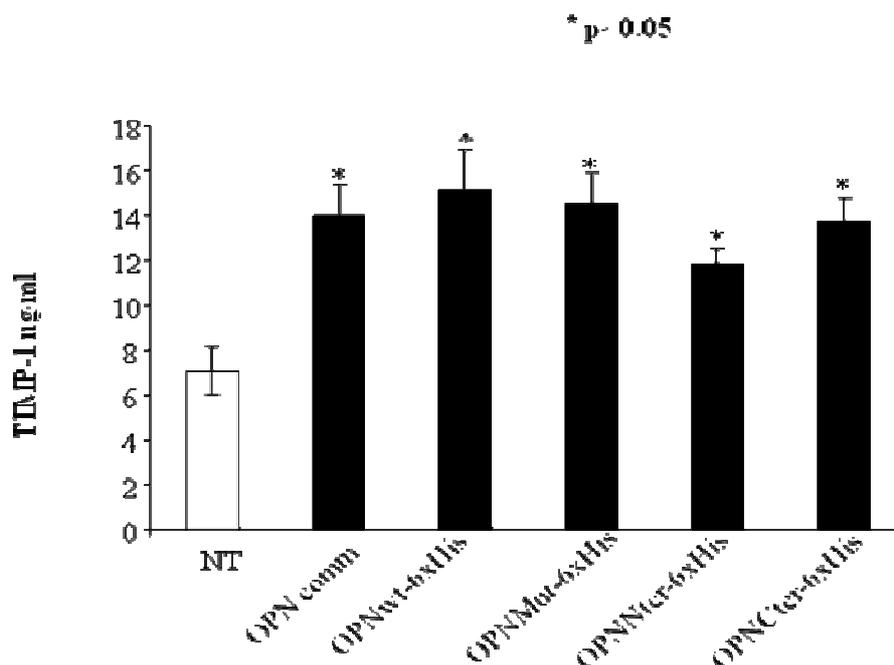


Figura7. Effetti di OPN ricombinante sull'espressione di TIMP-1 da parte di monociti. I monociti sono stati stimolati con i diversi costrutti di OPN ricombinante a concentrazioni equimolari: OPN commerciale (R&D System), OPN wt e OPN-Mut (1µg/ml); OPN N-ter e C-ter (0,5µg/ml). I surnatanti sono stati raccolti dopo 48h di stimolazione e la produzione di TIMP-1 è stata valutata con un saggio ELISA. Nel grafico sono rappresentate la media ± l'errore standard di 6 esperimenti indipendenti. *p<0,05 rispetto alla condizione senza alcun trattamento, utilizzando il test di Wilcoxon.

Produzione di anticorpi anti-OPN

Le proteine ricombinanti da noi prodotte sono state utilizzate come esca nella ricerca di anticorpi specifici per il frammento N- o C-terminale, mediante la tecnologia del phage-display. Si tratta di un metodo *in vitro* per selezionare anticorpi, che si basa sulla creazione di librerie di anticorpi di grandi dimensioni, dai quali gli anticorpi monoclonali leganti l'antigene di interesse possono essere selezionati. I frammenti anticorpali sono stati successivamente ingegnerizzati per incorporare la regione Fc e formare proteine di fusione scFv-Fc o "miniantibodies". Questo permette di aumentare la stabilità della molecola e di migliorare la loro efficacia terapeutica grazie alla citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e alla citotossicità complemento-dipendente (CDC) mediata dalla porzione Fc.

Nel nostro caso con questo metodo sono stati identificati 3 frammenti anticorpali: 2 diretti contro la porzione N-terminale (chiamati A3 e H11) e 1 contro la porzione C-terminale di OPN. Le porzioni VH/VL identificate mediante phage-display sono state fuse alla sequenza che codifica per il CH2-CH3 delle IgG1 umane, mediante clonaggio nel vettore pHYGRO, ingegnerizzato dal laboratorio del Prof. Sblattero. I miniantibodies così prodotti sono stati clonati nel vettore pUCOE precedentemente descritto e trasfettati stabilmente in cellule CHO-s. Questo ha permesso, ancora una volta di ottimizzare la produzione della molecola corrispondente. La **figura 8** mostra l'analisi Western blot dei surnatanti di coltura di cellule che producono stabilmente ognuno di questi anticorpi, decorato con anticorpo anti-SV5.

Le rispettive cellule sono state coltivate in terreno sintetico e la proteina corrispondente purificata mediante cromatografia per affinità su colonna di proteina A. Anche in questo caso il prodotto della purificazione proteica è stato dializzato *overnight* contro PBS e controllato su gel di poliacrilammide colorato con blu di Coomassie. Il risultato, mostrato in **figura 9**, ha permesso di verificare la corretta concentrazione della preparazione proteica ottenuta, mediante il confronto con una curva di BSA a concentrazione nota, e di verificare l'assenza di proteine contaminanti o di bande di degradazione.

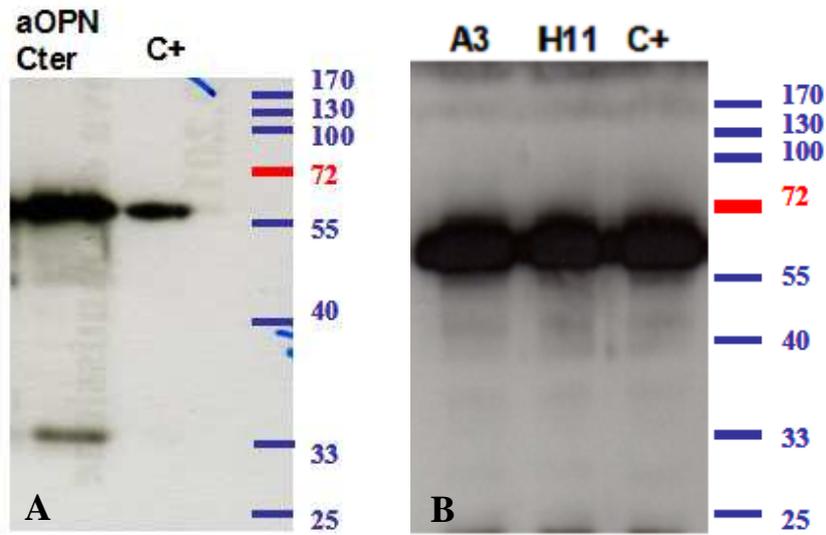


Figura8. Western Blotting dei surnatanti di coltura di cellule CHO-s trasfettate stabilmente con i plasmidi che codificano per miniantibodies anti-OPN. Le sequenze VH/VL specifiche per ciascun frammento di OPN sono state clonate nel vettore pHYGRO e prodotte come miniantibodies nel surnatante di coltura di cellule CHO-s trasfettate stabilmente. La figura mostra il Western Blot decorato con anticorpo anti-SV5 corrispondente al minibody specifico per la porzione C-terminale di OPN (A) e ai minibodies anti-OPN N-terminale (B)

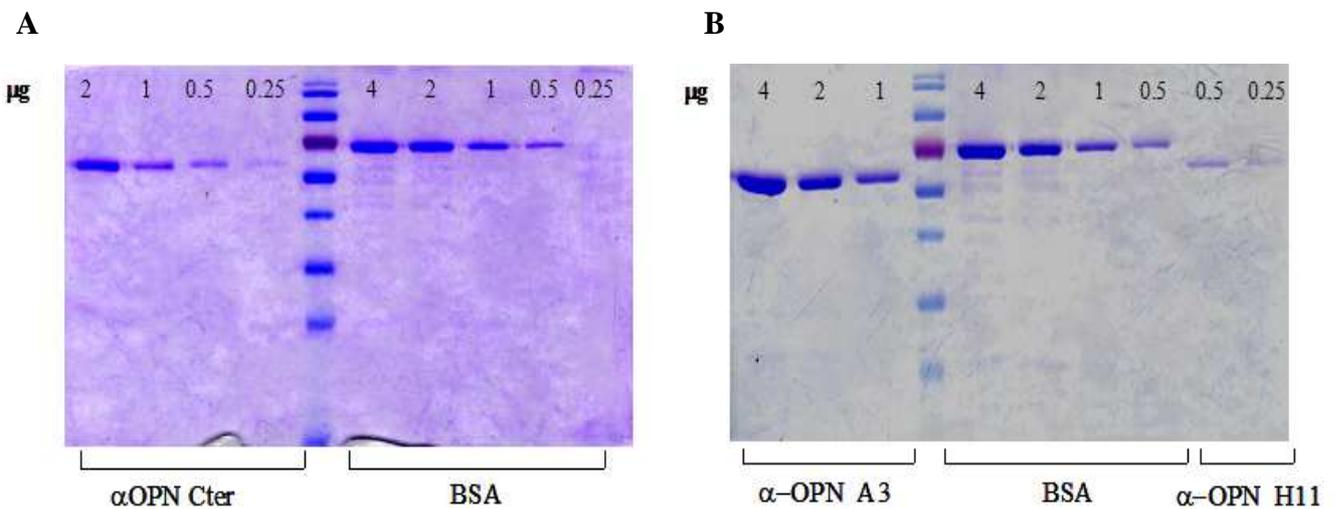


Figura9. Quantificazione su gel di poliacrilammide colorato con Blu di Coomassie. I prodotti di purificazione di ciascun miniantibody sono stati valutati su gel di Coomassie per stabilirne la corretta concentrazione e l'assenza di contaminanti. (A) minibody anti-OPN Cter; (B) minibodies anti-OPN Nter.

Riconoscimento di OPN da parte degli anticorpi anti-OPN

Gli anticorpi prodotti sono stati saggiati per la capacità di riconoscere le diverse porzioni di OPN e la molecola intera, mediante test ELISA diretto, in cui l'antigene è stato adsorbito sul fondo della piastra e il legame del miniantibody è stato visualizzato mediante l'aggiunta di un anticorpo capace di riconoscere il Fc coniugato ad HRP. La **figura 10** mostra il risultato ottenuto espresso come valore di assorbanza a 450nm. Come mostrato, l'anticorpo selezionato contro la porzione C-terminale riconosce questo frammento e la molecola intera, mentre non dà alcun segnale in presenza della sola porzione N-terminale della molecola. Al contrario l'anticorpo H11 selezionato contro la porzione N-terminale, riconosce questa porzione, ma solo in maniera ridotta la molecola intera. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il dominio riconosciuto dall'anticorpo sia mascherato nella molecola intera dalla presenza del dominio C-terminale. Inoltre questo anticorpo mostra un certo grado di legame anche per la sola porzione C-terminale di OPN. L'anticorpo A3 selezionato contro la porzione N-terminale di OPN potrebbe dare invece valori di OD450 molto basse e senza differenze sensibili tra le diverse molecole ricombinanti di OPN; questo risultato sembrerebbe indicare che tale anticorpo sia un aspecifico.

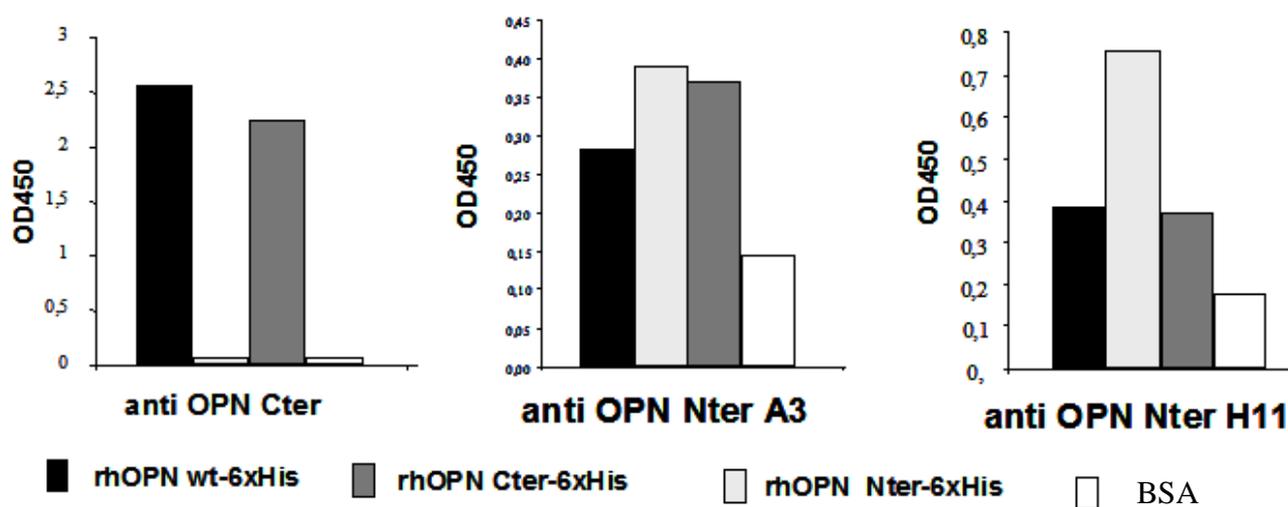


Figura 10. ELISA diretto con minibodies anti-OPN. I minibodies sono stati testati per la capacità di riconoscimento di 2µg/ml di ciascuna molecola ricombinante di OPN. Il legame è stato visualizzato mediante l'ausilio di un anti-Human coniugato con HRP.

Valutazione della azione bloccante OPN degli anticorpi trovati

Il saggio di protezione dalla morte cellulare è stato utilizzato per verificare l'abilità del minibody anti-OPN C-terminale di inibire la capacità di OPN di proteggere i linfociti T attivati dalla morte cellulare indotta da attivazione. Come mostrato in **figura 11** la percentuale di sopravvivenza delle cellule stimulate in presenza di rhOPN e contemporaneamente dell'anti-OPN C-terminale è del tutto paragonabile a quella delle cellule stimulate in presenza del solo anti-CD3. Questo risultato indica che tale anticorpo è in grado di inibire totalmente gli effetti anti-apoptotici di OPN.

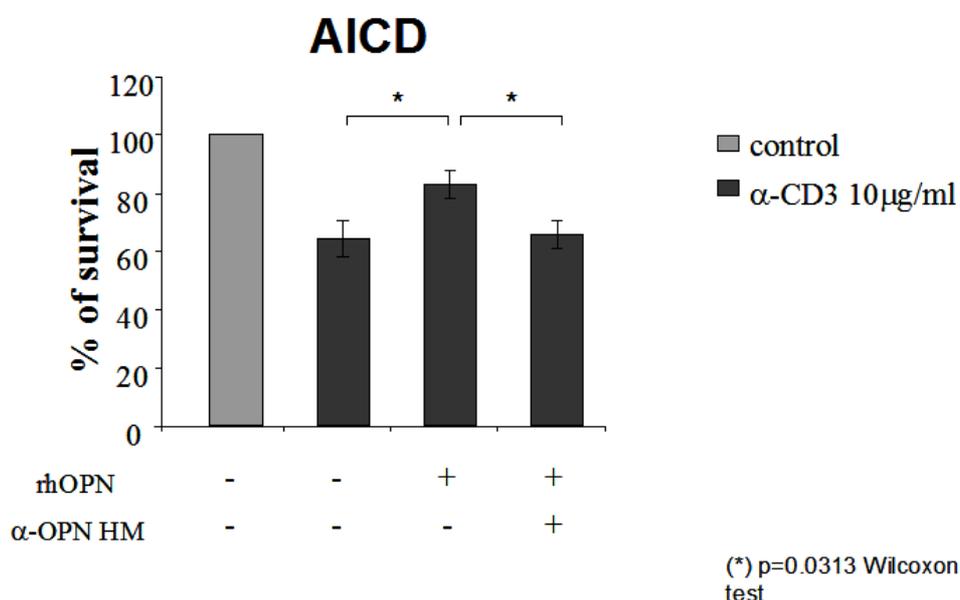


Figura 11 Effetti dell'anti-OPN C-ter sulla sopravvivenza dei linfociti T. I linfociti T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 µg/ml) per indurre attivazione in presenza o in assenza 1µg/ml di OPN commerciale e/o di 10µg/ml dell'anti-OPN. I risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare. Nel grafico sono rappresentate la media ± l'errore standard di 5 esperimenti indipendenti. *p<0,05 rispetto alla condizione con rhOPN utilizzando il test di Wilcoxon.

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 $\alpha4\beta1$ 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 $\alpha4$ o $\beta1$ 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. 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 incapace di generare i due frammenti e di legare l'integrina $\alpha4\beta1$.

Al fine di aumentare la produzione delle molecole ricombinanti, il cDNA ad esse corrispondente è stato clonato nel vettore di espressione eucariotico pUCOE-MB, ingegnerizzato dal gruppo di lavoro del Prof. Sblattero. Questo vettore 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.

I plasmidi ricombinanti corrispondenti sono stati trasfettati in cellule CHO-s coltivate in terreno sintetico, e il relativo surnatante di coltura è stato analizzato mediante western blotting con anticorpi specifici per la due metà di OPN e contro il tag di 6 istidine. Le molecole ricombinanti umane sono state purificate mediante cromatografia su colonna al Nichel e quantizzate mediante densitometria sulla base di una curva di BSA a concentrazione nota. La digestione enzimatica con trombina delle molecole ricombinanti intere hanno dimostrato che le mutazioni inserite nel cDNA di OPN rendono la molecola capace di resistere all'azione proteolitica della trombina.

Al fine di verificare la funzionalità delle molecole prodotte è stato allestito un saggio di morte dei linfociti attivati che ha permesso in primo luogo di dimostrare che la molecola full-length da noi prodotta è in grado di agire in maniera del tutto sovrapponibile a quella commerciale. Inoltre la valutazione dell'AICD ha dimostrato che la protezione dalla morte cellulare in seguito ad attivazione è mediata da entrambi i frammenti della molecola. Questi risultati confermano il ruolo di OPN nella ricaduta e nella progressione delle malattia autoimmune, e sono in linea con i dati di letteratura che descrivono come l'interazione tra OPN e CD44, quindi attraverso il coinvolgimento della porzione C-terminale, attiva segnali di sopravvivenza. Questo risultato è, inoltre, in linea con i nostri dati che dimostrano che il frammento N-terminale favorisce la secrezione di IL-17, il cui ruolo come fattore in grado di inibire l'apoptosi è stato riscontrato nel nostro laboratorio oltre ad essere stato descritto dalla letteratura [68]. Questo non esclude il possibile intervento di altri fattori innescati da OPN, quali la secrezione di altre citochine e la trasmissione di segnali di sopravvivenza tramite le integrine.

Un secondo dato ottenuto è la dimostrazione che il trattamento con OPN induce la secrezione di IL-17, una citochina chiave nella patogenesi della SM, da parte di linfociti T CD4⁺. Questo effetto sembra prevalentemente legato all'azione della porzione N-terminale della molecola. Anche questo risultato è in linea con recenti dati di letteratura che dimostrano come il trattamento di linfociti T CD4⁺ con OPN induce la secrezione di IL-17 e che questo effetto è inibito da un anticorpo bloccante le integrine beta 3, il cui sito di legame è localizzato nella porzione N-terminale di OPN [69]. Questi dati suggeriscono l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante diretto contro tale porzione di OPN come possibile strumento terapeutico per inibire la secrezione di IL-17 e migliorare il decorso della SM.

Infine sono state testate le differenti forme di OPN sulla secrezione monocitaria di TIMP-1, una proteina che si trova in molti tessuti e fluidi biologici, espressa da diversi tipi cellulari, inclusi linfociti B attivati del centro germinativo, cellule di linfoma di Burkitt, linfociti T e monociti. Oltre

ad essere un inibitore delle metalloproteasi, TIMP-1 esercita attività anti-apoptotiche su diversi tipi di cellule. In passato è stato dimostrato che OPN è in grado di indurre secrezione di TIMP-1 da parte di monociti e che TIMP-1 inibisce, *in vitro*, sia l'AICD che la morte indotta da Fas dei linfociti T. I risultati confermano che OPN è in grado di indurre la produzione di TIMP-1 e indicano che questo effetto è ascrivibile in più larga misura alla porzione C-terminale della molecola. Questo risultato sarebbe in linea con i dati di letteratura che dimostrano come il trattamento con OPN in combinazione ad un anticorpo bloccante CD44, il cui sito di legame si trova nel frammento C-terminale, inibisce la produzione di TIMP-1 [70].

I risultati da noi ottenuti ci permettono di fornire nell'insieme, indicazioni sull'importante ruolo che OPN gioca nella patogenesi e nella progressione della SM, mettendo in evidenza soprattutto due meccanismi con i quali può agire: stimolazione dell'espressione di mediatori pro-infiammatori e inibizione dell'apoptosi di linfociti T. Studi ulteriori dovranno essere effettuati per caratterizzare meglio la funzione di queste molecole attraverso l'utilizzo *in vivo* delle proteine murine. Ciononostante si può affermare che i due frammenti di OPN si presentano come potenziali target per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche per la Sclerosi Multipla o altre malattie autoimmuni in cui essa è coinvolta.

A tale fine i frammenti N- e C-terminale da noi prodotti sono stati utilizzati per la ricerca di anticorpi specifici per ciascun frammento in una libreria anticorpale, mediante la tecnologia del phage-display. Questa strategia ci ha permesso di identificare 2 anticorpi: uno diretto verso la porzione C-terminale di OPN e uno selezionato per la sua capacità di interagire con la porzione N-terminale, ma che possiede una seppur minima cross-reattività per la porzione C-terminale della molecola. Questi anticorpi si offrono come possibili strumenti atti a mettere ad antagonizzare gli effetti pro-infiammatori e/o antiapoptotici di OPN. In particolare l'anticorpo diretto verso la porzione C-terminale della molecola si è dimostrato in grado di annullare la capacità di OPN di ridurre la morte cellulare indotta da attivazione.

La capacità mostrata da entrambi questi anticorpi di riconoscere la corrispondente molecola murina (dato non mostrato) li rende inoltre un ottimo strumento per l'allestimento di studi ulteriori *in vivo* nel modello murino della SM (EAE) finalizzati a mettere a punto un protocollo di immunizzazione passiva contro OPN.

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. Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M.C., Ranchin, B. et al. (2009). *Nature Immunol.* **10**, 778-785.
69. Murugaiyan, G., Mittal, A., Weiner, H.L. (2008). *J Immunol.* **181**, 7480-8.
70. Pardo, A., Gibson, K., Cisneros, J., Richards, T.J., Yang, Y., Becerril, C., et al. (2005). *PLoS Med.* **2**, 251.

SEMINARI III ANNO DI DOTTORATO 2011/2012

1. “Neuronal death: recruitment of programmed necrosis and autophagy: oxidative stress and recruitment of autophagy to brain cell death”; tenuto dal Professor Philip Beart, (Florey Neuroscience Institutes, University of Melbourne, Parkville, Australia); Dipartimento di Scienze Mediche, 20 Luglio 2012
2. “Neuronal death: recruitment of programmed necrosis and autophagy: brain, brain quite contrary how do you neurones die? programmed cell death”; tenuto dal Professor Philip Beart, (Florey Neuroscience Institutes, University of Melbourne, Parkville, Australia); Dipartimento di Scienze Mediche, 19 Luglio 2012
3. “*Molecular control of human fetal globin expression: towards a potential cure for β -thalassemia and sickle cell anemia*”; tenuto dal Prof. Sjaak Philipsen, (erasmus mc-cell biology, dr. molewaterplein 50, 3015 ge rotterdam the netherlands homepage: http://www.erasmusmc.nl/medical_genetics/); Dipartimento di Scienze Mediche, 13 Luglio 2012
4. “*Next generation sequencing in T-ALL*”; tenuto dal Dr. Kim De Keersmaecker, (VIB Center for the Biology of Disease Center for Human Genetics, KU Leuven - Campus Gasthuisberg O&N4, Herestraat 49 – box 602, 3000 Leuven, Belgium); Dipartimento di Scienze Mediche, 10 Luglio 2012
5. “*IFI16: innate recognition of double-stranded DNA - and beyond*”; tenuto dal Prof. Søren Riis Paludan, (Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark); Dipartimento di Scienze Mediche, 28 Giugno 2012
6. “*Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: from microRNA Regulation to Targeted Gene Transfer*”; tenuto dal Prof. Luigi Naldini, (San Raffaele, Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET) Via Olgettina, 58 - 20132 Milan - ITALY); Dipartimento di Scienze Mediche, 21 Giugno 2012
7. “*SEDDA: Scale for Early Detection of Drug Abuse*”; tenuto dal Prof. Daniel Lloret, (PhD student, Università Miguel Hernandez (Alicante – Spagna); Dipartimento di Scienze Mediche, 18 Giugno 2012
8. “*High-throughput Biochemical Target Investigation Unveils a Novel Function of miR-21 as a Negative Modulator of Signal Transduction in T-lymphocytes*”; tenuto dal Prof. Pino Macino, (Professor of Biology, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza" Viale Regina Elena 324, 00161 Rome Italy); Dipartimento di Scienze Mediche, 15 Giugno 2012
9. “Association of Merkel cell polyomavirus with human tumors”; tenuto dal Prof. Mauro Tognon, (Professor Chair of Applied Biology School of Medicine, University of Ferrara); Dipartimento di Scienze Mediche, 14 Giugno 2012
10. “*Peripheral T-cell lymphoma: from biology to clinical management*”; tenuto dal Prof. Pier Paolo Piccaluga, (Università di Bologna); Dipartimento di Scienze Mediche, 31 Maggio 2012
11. “*Convivere con la Leucemia Mieloide Cronica*”; tenuto dal Prof. Gianluca Gaidano, (Università del Piemonte Orientale); Dipartimento di Scienze Mediche, 29 Maggio 2012
12. “*Genetics and Molecular Medicine*”; tenuto dal Prof. Steve Ellis, (University of Louisville Kentucky, USA); Dipartimento di Scienze Mediche, 21-25 Maggio 2012 e 28-01 Giugno 2012
13. “*Numerical simulations as virtual microscope at the nanoscale: some examples with dendritic molecules*”; tenuto dal Prof. Andrea Dadani, (Chief of the Laboratory of Applied Mathematics and Physics- LAMFI, Department of Innovative Technologies-DTI, University of Applied Science of Southern Switzerland-SUPSI, Lugano, CH); Dipartimento di Scienze Mediche, 23 Maggio 2012

14. “*Global Public Health Preparedness Case Studies of Bioterrorism, a Pandemic and a Radiologic Event*”; tenuto dal Prof. Kristi L. Koenig, (MD, FACEP, FIFEM, Professor of Emergency Medicine Director, Center for Disaster Medical Sciences University of California, Irvine USA); & “*Designing a Medical Research Project*”, tenuto dal Prof. Samuel Stratton, (MD, MPH Professor of Medicine University of California, Los Angeles USA); Dipartimento di Scienze Mediche, 22 Maggio 2012
15. “*Microparticles as novel effectors in Inflammation*”; tenuto dal Prof. Mauro Perretti, (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 16 Maggio 2012
16. “*Resolvins and Omega-3 in Inflammation*”; tenuto dal Prof. Mauro Perretti, (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 15 Maggio 2012
17. “*A translational approach to the study of endometriosis*”; tenuto dalla Prof.ssa Paola Panina-Bordignon, (Genetic and Cellular Biology division, San Raffaele del Monte Tabor Foundation, Milan); Dipartimento di Scienze Mediche, 10 Maggio 2012
18. “*Seminario di Oncologia Orale*”; tenuto dalla Prof.ssa Giuseppina Campisi, (Professore di Patologia Orale Univ degli Studi di Palermo); Dipartimento di Scienze Mediche, 08 Maggio 2012
19. “*Developing strategies for tissue specific targeting*”, tenuto dal Prof. Costantino Pitzalis, (Barts and the London School of Medicine); Dipartimento di Scienze Mediche, 28 Marzo 2012
20. “*Role of Diacylglycerol kinases in the control of T cell activation and differentiation programs*”, tenuto dal Prof. Isabel Merida, (Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid); Dipartimento di Scienze Mediche, 23 Marzo 2012
21. “*Molecular classification of multiple myeloma*”, tenuto dal Prof. Antonino Neri, (Università degli Studi di Milano); Dipartimento di Scienze Mediche, 22 Marzo 2012
22. “*Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion*”, tenuto dalla Dott.ssa Elena Rainero, (Beatson Cancer Institute, Glasgow, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 08 Marzo 2012
23. “*Exosomes Shuttle RNA*”, tenuto dal Prof. Lötvall J., (Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg); Dipartimento di Scienze Mediche, 24 febbraio 2012
24. “*Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics*”, tenuto dal Dr. Paolo Fortina, (Department of Cancer Biology, Jefferson Genomics Laboratory, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University Jefferson Medical College, Philadelphia, PA, USA); Dipartimento di Scienze Mediche, 25 gennaio 2012
25. “*Hepatocellular Carcinoma, novel advances from genomics to treatment*”, tenuto dal Dr. Rohini Sharma, (Imperial College London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 13 gennaio 2012
26. “*Bio-synthetic interfaces: from explosives to bone*”, tenuto dalla prof.ssa Marta Cerruti, (Canada Research Chair in Bio-synthetic interfaces Materials Engineering, McGill University, Montreal, Canada); Dipartimento di Scienze Mediche, 09 Gennaio 2012
27. “*Galectins-carbohydrate binding protein: sweet or sour?*”, tenuto dal prof. Prof. Mauro Perretti, (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 20 Dicembre 2011
28. “*Alpha-msh and the melanocortin system in inflammation*”, tenuto dal prof. Prof. Mauro Perretti, (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 19 Dicembre 2011

29. *“The resolution of inflammation: players and targets”*, tenuto dal prof. Prof. Mauro Perretti, (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 07 Novembre 2011
30. *“Magical Power of d-block Transition Metal Catalysis for a Prosperous and Sustainable World in the 21st Century and Beyond”*, tenuto dal Prof. Ei-Ichi Negishi, (Premio Nobel per la Chimica; Università di Purdue, Indiana, USA); Aula Magna Perrone, 26 Ottobre 2011
31. *“New trends in allergy and immunology”*, tenuto dal Prof. Joseph A. Bellanti, (Professor of Pediatrics and Microbiology-Immunology Director, International Center for Interdisciplinary Studies of Immunology Georgetown University School of Medicine); Dipartimento di Scienze Mediche, 10 Ottobre 2011
32. *“La rivoluzione genetica nella sclerosi laterale amiotrofica”*, tenuto dal Prof. Adriano Chiò, (Professore Associato Neurologia, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi, Torino); Dipartimento Scienze Mediche, 07 Ottobre

PARTECIPAZIONE A CORSI DI FORMAZIONE

Corso Teorico Pratico sulla Citometria a Flusso BD Italia, Buccinasco (MI)

English Course ABES School, Novara (NO)

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:

DIFFERENTIAL INDUCTION OF TH-17 AND TH-9 CYTOKINES IN HUMAN NAÏVE T HELPER CELLS BY B7h- AND B7.1-MEDIATED COSTIMULATION. C. Luca Gigliotti, Riccardo Mesturini, **Maria F. Soluri**, Elena Boggio, Annalisa Chiocchetti, and Umberto Dianzani-European Congress of Immunology September 2012 Glasgow UK (Poster).

FUNCTIONAL MAPPING OF OSTEOPONTIN ACTIVITY IN EAE AND MS. **Soluri MF**, Clemente N, Orilieri E, Cappellano G, Boggio E, Dianzani U, Chiocchetti A. Congresso Scientifico FISM 2012, Roma (Poster)

PUBBLICAZIONI

1. Boggio E, Melensi M, Bocca S, Chiocchetti A, Comi C, Clemente N, Orilieri E, **Soluri MF**, D'Alfonso S, Mechelli R, Gentile G, Poggi A, Salvetti M, Ramenghi U, Dianzani U. The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function. *Hum Immunol.* 2012 May;73:585-92.
2. Sergio Occhipinti, Chiara Dianzani, Annalisa Chiocchetti, Elena Boggio, Nausicaa Clemente, Casimiro Gigliotti, **Maria F Soluri**, Rosalba Minelli, Roberto Fantozzi, Junji Yagi, Jose Rojo, Daniele Sblattero, Mirella Giovarelli and Umberto Dianzani. Triggering of B7h by the inducible costimulator modulates maturation and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Submitted Journal of Immunology.*
3. Mesturini Riccardo, Gigliotti Casimiro, Orilieri Elisabetta, Cappellano Giuseppe, **Soluri, Maria F**, Boggio Elena, Woldetsadik Abiy, Dianzani Chiara, Sblattero Daniele, Chiocchetti Annalisa, Yagi Junji, Rojo, Josè and Dianzani Umberto Differential induction of IL-17, IL-10, and IL-9 in human T helper cells by B7h and B7.1. *Submitted Cytokine.*
4. Maurizio Aricò, Elena Boggio, Valentina Cetica, Matteo Melensi, Elisabetta Orilieri, Nausicaa Clemente, Giuseppe Cappellano, Sara Buttini, **Maria Felicia Soluri**, Cristoforo Comi, Carlo Dufour, Daniela Pende, Irma Dianzani, Steven R. Ellis, Sara Pagliano, Stefania Marcenaro, Ugo Ramenghi, Annalisa Chiocchetti and Umberto Dianzani. Variations of the UNC13D gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome Running short title: Role of UNC13D gene in ALPS/DALD development. *Submitted Human Mutations.*