

Università degli studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXVI* *Relazione II anno(2011-2012)*

*Ruolo di osteopontina nella sclerosi multipla e nella
polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica.*

RESPONSABILE del progetto:
Dr. Cristoforo COMI

CANDIDATO:
Sara BUTTINI

INTRODUZIONE

- Sclerosi multipla
- Immunopatogenesi della SM
- Polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica
- Patogenesi della CIDP
- Osteopontina
- Ruolo di OPN nell'immunità innata e acquisita
- Ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni
- Scopo del lavoro

MATERIALI E METODI

- Pazienti
- Saggio ELISA per la valutazione di OPN plasmatica
- Estrazione di DNA da sangue
- Quantificazione spettrofotometrica del DNA
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
- Elettroforesi su gel di agarosio
- Sequenziamento automatico
- Analisi statistica

RISULTATI

1. Ruolo di OPN nella SM

- 1.1 Analisi della variazione nucleotidica +1239A>C in pazienti con SM
- 1.2 Analisi della variazione nucleotidica -156G>GG in pazienti con SM
- 1.3 Analisi delle variazioni +1239A>C e -156G>GG nella progressione e nel decorso della SM
- 1.4 Impatto clinico delle variazioni +1239A>C e -156G>GG sulle esacerbazioni della SM

2. Ruolo di OPN nella CIDP

- 2.1 Valutazione dei livelli plasmatici di OPN in pazienti con CIDP
- 2.2 Analisi della variazione nucleotidica +1239A>C in pazienti con CIDP

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

BIBLIOGRAFIA

ATTIVITÀ FORMATIVA SVOLTA
PARTECIPAZIONE A CONGRESSI
PUBBLICAZIONI

INTRODUZIONE

Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC), associata a demielinizzazione e danno assonale [1].

La malattia colpisce con frequenza doppia le donne rispetto agli uomini e, generalmente, insorge tra i 20 e i 40 anni. Raramente può essere diagnosticata in bambini di età inferiore a 10 anni o in pazienti di età superiore ai 50 anni. La distribuzione della malattia ha una frequenza disomogenea nelle diverse aree del pianeta: è più frequente nel nord Europa, nella zona meridionale del Canada e settentrionale degli USA, Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda. In Italia la SM ha una prevalenza di circa 100 casi ogni 100.000 abitanti [2].

I sintomi clinici sono correlati alla demielinizzazione che colpisce il SNC, mentre il sistema nervoso periferico (PNS) non viene invece coinvolto. I sintomi iniziali della malattia possono includere debolezza muscolare a uno o ad entrambi gli arti (specie a carico di quelli inferiori), disturbi sensoriali, disturbi visivi tra cui la neurite ottica e diplopia (visione doppia), andatura instabile e atassia (perdita progressiva della coordinazione muscolare che rende difficoltosa l'esecuzione dei movimenti volontari).

La malattia può manifestarsi brutalmente con alcuni di questi sintomi, ma in alcuni casi essi possono essere così irrilevanti da non essere percepiti dal paziente per lungo tempo.

Con il peggioramento della malattia alcuni pazienti presentano disfunzioni alla vescica, affaticamento e sensibilità al calore. I sintomi secondari includono il segno di Uhthof (peggioramento transiente dei sintomi esistenti in seguito ad aumento della temperatura corporea, come ad esempio dopo l'attività fisica o dopo un bagno caldo) e il segno di Lhermitte (sensazione di scossa elettrica che percorre la colonna vertebrale e gli arti inferiori in seguito alla flessione del collo), ma anche vertigini, spasmi muscolari e altri segni parossistici. I deficit cognitivi sono comuni, soprattutto nei casi più gravi, e includono perdita della memoria, problemi di attenzione, difficoltà nel risolvere i problemi. La depressione è molto frequente nei pazienti durante il corso della malattia e il suicidio è 7.5 volte maggiore rispetto ai soggetti non malati.

L'80%-85% dei pazienti segue un decorso di malattia di tipo recidivante-remittente (SMRR), caratterizzato da episodi sintomatici acuti (detti esacerbazioni o ricadute), seguiti da una fase di remissione in cui non si ha, però, un recupero totale. Il 50% di questi pazienti entra, poi, in fase secondariamente progressiva (SMSP), in cui si assiste ad un declino costante delle funzionalità neurologiche. Il 15%-20% dei pazienti a cui viene diagnosticata la SM è affetto, invece, dalla forma

primariamente progressiva (SMPP), in cui fin dall'insorgere dei primi sintomi vi è un costante peggioramento delle condizioni neurologiche [2].

La SM è una malattia difficile da diagnosticare in quanto i suoi segni e sintomi clinici possono essere presenti anche in altre malattie. Tuttavia sono stati proposti diversi criteri diagnostici per facilitare e standardizzare la diagnosi nelle prime fasi della malattia. Attualmente i criteri di McDonald [3] mirano principalmente a una diagnosi non invasiva basata sulle caratteristiche cliniche, eventualmente con l'aggiunta di ulteriori analisi come la risonanza magnetica (MRI, *magnetic resonance imaging*), utile per identificare la presenza e la localizzazione di lesioni cerebrali, e l'esame del fluido cerebrospinale (CSF).

Il 95% dei pazienti mostra aree di demielinizzazione (lesioni o placche) multiple e asimmetriche nella sostanza bianca del SNC, maggiormente presenti nel corpo calloso e nelle regioni periventricolari. Inoltre nuove lesioni possono essere individuate dall'estruzione del metallo pesante gadolinio che avviene nei pressi della barriera emato-encefalica che risulta danneggiata ed è spesso associata alla presenza di infiammazione perivenosa. Tecniche più sofisticate possono ulteriormente identificare lesioni a carico del midollo spinale.

Il 90% dei pazienti mostra la presenza di bande oligoclonali di tipo IgG dopo l'elettroforesi delle proteine presenti nel CSF.

L'evoluzione della malattia si protrae per diverse decadi. Mediamente la morte sopraggiunge 30 anni dopo la comparsa della malattia e questo significa che l'aspettativa di vita di un paziente con SM è inferiore di 5 - 10 anni rispetto a individui non affetti [1].

Non esiste una cura per la SM. Le terapie attualmente utilizzate sono indirizzate a ridurre e migliorare il decorso della malattia. Il metilprednisolone, corticosteroide dalle proprietà anti-infiammatorie, viene utilizzato nel trattamento della forma RR, in quanto è efficace nel ridurre la gravità e la durata delle esacerbazioni. Solitamente i corticosteroidi orali o IV non sono utilizzati per trattamenti a lungo termine, ma vengono somministrati per brevi periodi (giorni) per ridurre gli effetti collaterali secondari ad un uso prolungato che possono includere disordini gastrointestinali, cambiamenti nello stato mentale e diverse infezioni. Le terapie a lungo termine includono invece l'utilizzo di immunosoppressori o immunomodulanti come ad esempio IFN β -1a e 1b, glatiramer acetato e natalizumab, che portano a una più lenta progressione della malattia. Tuttavia le forme cliniche progressive sono resistenti a questo tipo di trattamento.

L'eziologia della SM rimane ancora sconosciuta. Diversi dati suggeriscono che fattori ambientali in individui geneticamente suscettibili sono responsabili di una alterata risposta immune contro antigeni *self* con conseguente infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione.

I virus herpes simplex 1 e 2, il citomegalovirus, il virus di Epstein-Barr, il virus del morbillo, della parotite e della rosolia sono stati associati alla SM e potrebbero avere un ruolo nell'induzione della risposta autoimmune.

Per quanto riguarda i fattori genetici, studi di *linkage* hanno identificato una stretta associazione con la malattia nella regione di classe II (HLA-D) del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), situata sul cromosoma 6p21. Altri geni di suscettibilità per la malattia sono il gene che codifica per CD25, la catena α del recettore ad alta affinità per IL-2 (IL2-RA) e il gene che codifica per il recettore di IL-7 (IL7R). Altre indagini hanno invece coinvolto osteopontina (OPN), la proteina basica della mielina (MBP), interferone- γ (IFN- γ) e IL-2 [4].

Immunopatogenesi della SM

Diversi dati supportano l'ipotesi che la SM è una malattia autoimmune. In particolare:

- cellule infiammatorie sono presenti nelle lesioni demielinizzanti;
- la suscettibilità della malattia è associata a geni coinvolti nel controllo della risposta immune;
- il decorso della malattia può essere modificato da terapie immunomodulanti;
- presenza di anticorpi oligoclonali nel CSF.

In aggiunta il modello animale della SM, encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), presenta diverse analogie con la malattia umana. Essa viene indotta immunizzando l'animale con proteine o peptidi derivati dalla mielina come la proteina proteolipidica (PLP), la glicoproteina oligodendrocitica (MOG) e la proteina basica della mielina (MBP). La malattia è mediata da linfociti T CD4+ specifici per la mielina e può essere trasmessa in animali sani in seguito all'iniezione di queste specifiche cellule. Come nella SM, l'animale sviluppa una malattia con decorso recidivante-remittente o progressivo cronico caratterizzato da infiammazione e demielinizzazione a carico del SNC. Cellule T reattive contro la mielina sono state identificate anche nel sangue periferico e nel CSF di pazienti affetti da SM.

Deve essere ancora chiarito in che modo avviene l'attivazione periferica di queste cellule T reattive. Il mimetismo molecolare (presenza negli agenti infettivi di antigeni simili al *self* che possono determinare una reazione autoimmune secondaria contro questi ultimi, dopo l'eliminazione dello stesso) o l'esposizione costitutiva di antigeni della mielina sono alcuni dei meccanismi proposti. Dopo l'attivazione periferica, i linfociti T autoreattivi attraversano la barriera emato-encefalica. Questo processo è mediato da molecole di adesione, chemochine e metallo proteinasi della matrice (MMPs). Una molecola chiave per questo processo è l'integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, *very late activation antigen-4*), espressa sulla superficie dei linfociti T attivati che interagisce con VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), espresso sulle cellule endoteliali [5]. L'anticorpo monoclonale

umanizzato natalizumab, utilizzato nel trattamento della SM, blocca la subunità α -4 dell'integrina, inibendo così la migrazione delle cellule autoreattive nel CNS [6].

Le MMPs sono enzimi proteolitici coinvolti nella distruzione della barriera emato-encefalica mediante la degradazione della matrice extracellulare e della membrana basale, ma hanno anche un ruolo nella demielinizzazione, nell'attivazione delle citochine e nel danno assonale. Sono stati identificati elevati livelli di MMP-9 nel sangue periferico e nel CSF di pazienti affetti da SM [7].

All'interno del SNC, microglia e macrofagi si comportano da cellule presentanti l'antigene (APC) e presentano antigeni della mielina mediante il MHC di classe II ai linfociti T CD4+ autoreattivi, che vengono così riattivati e sono in grado di differenziare nei diversi sottotipi linfocitari. La SM è sempre stata considerata come una malattia autoimmune mediata dai linfociti T *helper* di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla secrezione di citochine pro-infiammatorie come IFN- γ , importante per l'attivazione macrofagica. Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che anche i Th17, che secernono la citochina pro-infiammatoria IL-17, hanno un ruolo nella patogenesi di questa malattia. Infatti sono stati riscontrati alti livelli di IL-17 nel sangue periferico, nel CSF e nel tessuto cerebrale di pazienti con SM [8]. Inoltre la frequenza delle cellule Th17 nel CSF dei pazienti è aumentata durante le esacerbazioni rispetto alla fase di remissione della malattia. La caratterizzazione fenotipica di queste cellule ha rilevato una elevata espressione di marcatori di attivazione, molecole co-stimolatorie e molecole di adesione rispetto alle cellule Th1, mettendone in luce il potenziale patogenetico [9].

È stato dimostrato che il numero di cellule T regolatorie (Treg) CD4+ CD25+ nel sangue periferico e nel CSF di pazienti con SM è simile a quello dei soggetti sani, ma i pazienti hanno una ridotta capacità di sopprimere la risposta immune contro antigeni della mielina [10]. Tuttavia cellule Treg Foxp3+ non sono state identificate nel tessuto cerebrale di pazienti con SM e questo potrebbe dovuto all'assenza di soppressione da parte delle Treg nel CNS o a difetti nella migrazione o nella sopravvivenza di queste cellule nel SNC [5].

Anche i linfociti T CD8+ svolgono un ruolo importante nella patogenesi della SM. Essi sono presenti nell'infiltrato infiammatorio delle lesioni cerebrali di pazienti con SM [11]. Inoltre il loro trasferimento in modelli animali è in grado di indurre la malattia [12], suggerendo un ruolo di cellule effettrici nella patogenesi della SM. Il danno assonale è correlato all'elevato numero di linfociti CD8+ presenti nelle lesioni [13] e sembra essere causato da un attacco diretto ai neuroni da parte di queste cellule, mediato probabilmente dal rilascio di diversi mediatori chimici.

L'importanza di una risposta umorale nella patogenesi della SM è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali nel CSF dei pazienti [14]. Sono stati identificati anticorpi diretti

contro gli oligodendrociti che potrebbero contribuire alla demielinizzazione da parte dei linfociti B [15].

La demielinizzazione è la principale caratteristica clinica della SM, mentre la perdita assonale è correlata alla progressione della malattia ed è la principale causa della disabilità neurologica [16].

Diversi meccanismi possono concorrere al danno assonale e alla conseguente demielinizzazione cronica quali ad esempio un attacco diretto agli assoni, la presenza di mediatori solubili come proteasi, citochine pro-infiammatorie e radicali liberi rilasciati dall'ambiente infiammatorio circostante e la mancanza di fattori neurotrofici da parte degli oligodendrociti [17].

Polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica

La polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP) è una malattia immuno-mediata che colpisce il sistema nervoso periferico (PNS) [18]. In seguito alla comparsa dei sintomi clinici, la CIDP è caratterizzata da una lenta progressione, con continui peggioramenti presenti per almeno 8 settimane. Questo permette di distinguere la CIDP dalla AIDP (polineuropatia infiammatoria demielinizzante acuta), anche meglio nota come sindrome di Guillain-Barré (GBS), caratterizzata invece da una rapida progressione dei sintomi, che raggiunge il culmine della gravità dopo appena 4 settimane.

Le caratteristiche cliniche della malattia sono debolezza muscolare prossimale e distale, associata a perdita della sensibilità, riduzione (iporiflessia) o assenza (areflessia) dei riflessi tendinei, presenza di elevati livelli proteici nel fluido cerebrospinale (CSF) e diminuzione eterogenea della conduzione dei nervi in seguito a demielinizzazione [19, 20].

La malattia può manifestarsi in tutte le età, ma è più frequente dopo i 50 - 60 anni nei soggetti di sesso maschile. Le manifestazioni cliniche, l'età di insorgenza e il diverso decorso della malattia possono variare da paziente a paziente. A causa di questa eterogeneità sintomatica, la malattia non viene spesso riconosciuta. Inoltre, la mancanza di comuni criteri diagnostici e l'assenza di specifici test contribuiscono a sottostimarne l'incidenza. Nei diversi studi epidemiologici condotti finora la prevalenza è stimata tra 1 e 7 casi su 100.000 abitanti [21]. Uno studio condotto su pazienti provenienti dal nord Italia riporta una incidenza di 0,6 casi/anno su 100.000 [22].

Il quadro clinico della CIDP presenta il coinvolgimento selettivo del sistema nervoso periferico, di entrambi gli arti distali e prossimali e di entrambe le fibre motorie e sensoriali (in alcuni casi solo le fibre motorie o sensoriali possono essere interessate). È inoltre caratterizzato da un peggioramento con andamento progressivo o fluttuante [20]. Occasionalmente possono essere affetti anche i nervi cranici.

Sono state descritte diverse varianti della malattia sulla base della distribuzione dei sintomi. Ad esempio, la rara *acute onset* CIDP (a-CIDP) nella fase iniziale della malattia è caratterizzata da una

rapida comparsa dei sintomi (molto simile e difficilmente distinguibile dalla GBS), seguita successivamente da una progressione cronica.

La CIDP può essere associata a diverse condizioni, quali epatite C, malattia infiammatoria intestinale, linfoma, gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS), infezione da HIV (AIDS), trapianto d'organo e disordini del tessuto connettivale. Alcuni studi hanno dimostrato che la CIDP è più frequente in pazienti con diabete mellito rispetto alla popolazione generale, ma questa affermazione non è ampiamente condivisa. Inoltre, la CIDP è stata anche riscontrata in pazienti affetti dalla malattia di Charcot-Marie-Tooth, suggerendo che differenti meccanismi infiammatori sono presenti nelle neuropatie ereditarie e possono contribuire alla disabilità.

La CIDP può manifestarsi anche nell'infanzia. I soggetti affetti hanno una comparsa dei sintomi più rapida, una disabilità maggiore nel culmine della malattia e hanno più frequentemente un decorso di tipo RR rispetto ai pazienti adulti. Tuttavia i pazienti più giovani rispondono meglio al trattamento e hanno un esito della malattia più favorevole nel lungo termine.

Sono stati descritti tre tipi di decorso clinico della CIDP:

- 1) monofasico, caratterizzato dalla progressione della malattia fino alla completa remissione senza ricadute dopo il trattamento;
- 2) recidivante-remittente (RR), caratterizzato da periodi di ricadute della malattia seguite a periodi di completa remissione;
- 3) cronico progressivo, caratterizzato da un progressivo peggioramento delle condizioni.

Circa il 20-35% dei pazienti affetti da CIDP hanno la forma RR, mentre il 7-50% dei pazienti presentano la malattia nella forma monofasica [21].

Diversi gruppi hanno proposto delle linee guida per meglio definire e successivamente trattare in modo opportuno questa malattia. In generale, la diagnosi si basa principalmente sull'esame obiettivo del paziente durante una visita neurologica, valutando la presenza dei sintomi clinici caratteristici e sugli studi elettrofisiologici, che evidenziano spesso un rallentamento o un blocco nella conduzione dell'impulso elettrico nei nervi interessati per la presenza di demielinizzazione. Per confermare la diagnosi possono essere richiesti ulteriori esami di laboratorio per verificare l'aumento delle proteine nel CSF (la conta cellulare rimane su valori nella norma o solo leggermente aumentati) e la biopsia del nervo, generalmente quello surale, prova istologica della presenza di demielinizzazione e rimielinizzazione, spesso associata alla presenza di infiltrati infiammatori.

La terapia è indirizzata principalmente a bloccare la risposta immune per attenuare l'infiammazione e il processo di demielinizzazione. Per questo motivo deve essere iniziata tempestivamente, anche per prevenire il processo di perdita assonale secondaria che può portare a disabilità permanente.

Solitamente per il trattamento della CIDP si utilizzano immunoglobuline intravenose, plasmaferesi e corticosteroidi. Attualmente numerosi studi sono indirizzati a valutare un eventuale effetto benefico di trattamenti a base di immunosoppressori [18].

La prognosi a lungo termine dipende dall'età di insorgenza della malattia, dalle forme cliniche della malattia e dall'iniziale risposta al trattamento. Pazienti più giovani con una rapida insorgenza della malattia rispondono meglio al trattamento e hanno una completa remissione, mentre nei pazienti adulti (sotto i 60 anni) la completa remissione dopo il trattamento si verifica con una minore frequenza. Inoltre la debolezza prossimale è associata a un tasso di remissione più alto e ad una migliore prognosi rispetto alle forme cliniche con debolezza distale. Il decorso cronico progressivo della malattia e la degenerazione assonale sono fattori prognostici negativi: pazienti con decorso monofasico o di tipo RR hanno generalmente una prognosi migliore. Di conseguenza la tempistica per iniziare il trattamento dalla diagnosi della malattia potrebbe essere un fattore molto rilevante nel determinare una prognosi più favorevole [21].

Patogenesi della CIDP

La CIDP è considerata una malattia immuno-mediata organo-specifica in cui l'immunità cellulare e umorale interagiscono tra loro per organizzare una risposta contro antigeni presenti sul nervo periferico. Nonostante siano stati condotti diversi studi, non è stato ancora identificato l'antigene bersaglio responsabile di questa risposta autoimmune [18].

Analisi immunoistochimiche di campioni di nervo di pazienti affetti da CIDP mostrano la presenza di cellule T con recettori $\gamma\delta$, suggerendo una risposta a un antigene non proteico [23]. Inoltre nei pazienti è stato riscontrato un aumento della concentrazione sierica del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e IL-2, che suggeriscono una attivazione delle cellule T [24, 25].

Studi condotti su analisi istologiche di campioni prelevati da pazienti o da modelli animali dimostrano la presenza di popolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+.

La migrazione delle cellule T attivate nel tessuto nervoso periferico dipende dall'interazione tra le molecole di superficie presenti sulle cellule T e le molecole di adesione presenti sulle cellule endoteliali. È stato dimostrato un aumento delle molecole di adesione, delle metallo proteinasi della matrice extracellulare e delle chemochine nel CSF e nei nervi di pazienti con CIDP [18, 21]. Inoltre nelle biopsie di nervo surale di questi pazienti è stata rilevata una ridotta quantità di proteine delle giunzioni cellulari occludenti (*tight-junction*), quali claudina-5 (*claudin-5*) e ZO-1 (*zona occludens protein 1*) [26]. L'insieme di questi dati suggerisce la presenza di un danno alla barriera emato-nervosa (*blood-nerve barrier*), che può quindi essere attraversata dalle cellule T. Queste ultime devono successivamente essere riattivate nella guaina endoneurale, come è stato suggerito dal fatto

che le cellule di Schwann di campioni di nervo di pazienti con CIDP esprimono la molecola di adesione e stimolazione delle cellule T CD58 [27].

L'apoptosi delle cellule T è inoltre compromessa nei pazienti con CIDP che mostrano una ridotta funzione di Fas rispetto a pazienti affetti da GBS e soggetti sani. Questa difettiva funzione ha maggiore frequenza nei soggetti con decorso progressivo della malattia e che presentano danno assonale, suggerendo che essa ha un ruolo nel favorire lo sviluppo della malattia, ma anche nella sua evoluzione cronica [28]. In aggiunta è stato successivamente dimostrato che la valutazione della funzione di Fas potrebbe avere utili implicazioni prognostiche e terapeutiche in quanto permette di distinguere i pazienti a-CIDP (caratterizzati da una funzione difettiva) e i pazienti GBS [29].

Anche la soppressione delle cellule T è difettiva: recenti studi hanno dimostrato un ridotto numero e funzione di cellule T regolatorie circolanti in alcuni pazienti affetti da CIDP [30].

Fattori genetici coinvolti nel controllo dell'attivazione precoce delle cellule T potrebbero essere importanti nella patogenesi della malattia: è stata riportata una associazione con il genotipo omozigote per una ripetizione di GA a basso numero di copie nel gene *SH2D2A* che codifica per la proteina adattatrice specifica per le cellule T [31]. Questo genotipo potrebbe portare a una compromesso controllo e una difettiva eliminazione delle cellule T autoreattive.

Il potenziale ruolo delle molecole co-stimolatorie come B7-1 (CD80) [32] e BB-1 [33] è stato suggerito dal fatto che sono entrambi espressi nei campioni prelevati da biopsie di alcuni pazienti. È stato dimostrato che i topi NOD (diabetici non obesi) *knock-out* per la molecola co-stimolatoria B7-2 sviluppano spontaneamente una polineuropatia autoimmune molto simile a quella umana dal punto di vista clinico, elettrofisiologico e morfologico [34]. Un'altra molecola co-stimolatoria, ICOS è localizzata sulle cellule T e il suo ligando (ICOS-L) è stato identificato sui macrofagi presenti nei nervi di pazienti affetti da CIDP [35].

I macrofagi nella CIDP hanno un duplice ruolo: da una parte agiscono come cellule presentanti l'antigene sostenendo la risposta autoimmune e dall'altro sono responsabili del danno alla mielina [35], probabilmente aumentando la propria attività fagocitica e citotossica, mediante il rilascio di molecole quali radicali dell'ossigeno, metaboliti dell'ossido nitrico, metaboliti dell'acido arachidonico, proteasi e componenti del complemento [18, 21]. È stato infatti dimostrato che i macrofagi che invadono la guaina endoneurale esprimono ciclo-ossigenasi 2 e citochine proinfiammatorie [37].

Nonostante ciò, fin dagli anni '80 è stato suggerito un ruolo degli autoanticorpi nella patogenesi di questa malattia. Anticorpi contro proteine della mielina e gangliosidi sono stati però identificati solo in alcuni pazienti e quindi il loro significato non è stato ancora del tutto chiarito. L'iniezione intraneurale di immunoglobuline purificate da pazienti con CIDP in ratti porta al blocco della

conduzione e a demielinizzazione del nervo [21]. La proteina zero della mielina (MPZ) è ritenuta l'antigene responsabile di questo effetto in quanto sono stati identificati autoanticorpi contro questa proteina nel siero di pazienti con CIDP [38]. Inoltre nel modello murino il trasferimento di cellule T reattive contro questa proteina è in grado di indurre la neuropatia [39]. Un altro promettente candidato sembra essere la proteina periferica della mielina 2 (PMP2) [40].

Il beneficio terapeutico derivato dalla plasmateresi è considerato una importante prova a sostegno del ruolo degli autoanticorpi nella patogenesi della CIDP, ma i miglioramenti possono essere dovuti alla eliminazione di altri mediatori dell'infiammazione come l'ossido nitrico, citochine e fattori del complemento. Questi mediatori potrebbero contribuire al danneggiamento della mielina (demyelinizzazione) e determinare la conseguente perdita assonale che si verifica nella CIDP.

Il ruolo delle citochine pro-infiammatorie è supportato da studi che mostrano un aumento delle concentrazioni sieriche di TNF α in pazienti CIDP con una severa disabilità e una acuta progressione della malattia.

Inoltre cellule B di pazienti affetti da CIDP hanno una ridotta espressione di FCGR2B, un recettore inibitorio che previene l'ingresso delle cellule B nel centro germinativo per diventare plasmacellule IgG positive. Dopo il trattamento con immunoglobuline intravenose (IVIg), l'espressione di FCGR2B aumenta in monociti e cellule B. Inoltre più pazienti rispetto ai controlli presentano il polimorfismo 386C/120A del promotore di FCGR2B, che ne riduce l'attività stessa [21].

Osteopontina

Osteopontina (OPN) è una fosfoproteina glicosilata sintetizzata in una varietà di tessuti e cellule e secreta nei fluidi corporei. È stata originariamente identificata come una proteina della matrice ossea e successivamente come una citochina (Eta-1, *early T-cell activation*) prodotta dai linfociti T attivati e dalle linee cellulari trasformate. I recettori di OPN sono alcune integrine e varianti di CD44, ubiquitariamente espressi sulla superficie cellulare e mediano l'adesione, la migrazione e la sopravvivenza in diverse linee cellulari. Tramite questa interazione OPN è in grado di partecipare a diversi processi fisiologici e patologici come *wound healing*, rimodellamento osseo, tumorigenesi, infiammazione, patologie cardiovascolari e malattie autoimmuni.

Nel sistema immunitario OPN è espressa in diversi tipi cellulari quali macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche, cellule NK, linfociti B e T. L'aumento dell'espressione di questa proteina è associata alla patogenesi di diverse malattie autoimmuni, come è stato dimostrato nella SM, nel lupus sistemico eritematoso, nell'artrite reumatoide, nell'aterosclerosi, ma anche in altre malattie infiammatorie come le malattie cardiovascolari, la malattia infiammatoria intestinale e l'asma.

OPN è codificata da un gene polimorfico *SPP1* (*secreted phosphoprotein 1*), costituito da 7 esoni e 6 introni, localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (4q21-q25). La proteina *full-length* è costituita da

314 residui amminoacidici e ha un peso molecolare che varia tra 25 e 80 KDa, a seconda delle modificazioni post-traduzionali a cui è sottoposta, che includono glicosilazione, fosforilazione e taglio proteolitico ad opera della trombina. Queste modificazioni sono essenziali per le diverse attività mediate da OPN.

OPN contiene un dominio RGD (*arginine-glycine-aspartate domain*), comune alle proteine della matrice extracellulare, importante per il reclutamento delle integrine $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ e $\alpha v\beta 1$. 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 $\alpha 4$ e $\alpha 9$ ($\alpha 9\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$), come i leucociti. OPN subisce tagli proteolitici anche da parte delle metalloproteinasi in particolare della MMP-3 e della MMP-7 [41].

OPN contiene inoltre una regione ricca di aspartato, due siti di legame per l'eparina e una regione vicino al C-terminale che lega in modo specifico diverse varianti di CD44, in particolare l'isoforma -v6 e -v7. Questa interazione è importante per la funzione immunomodulatoria di OPN in quanto riduce l'espressione della citochina anti-infiammatoria IL-10 e favorisce invece la produzione della citochina pro-infiammatoria IL-12, polarizzando una risposta di tipo Th1 [42].

Inoltre uno studio ha dimostrato che CD44v6 blocca l'apoptosi Fas-mediata, interferendo probabilmente con la trimerizzazione del recettore, importante per l'avvio del programma apoptotico. OPN potrebbe favorire l'interazione tra CD44-v6 e Fas, esercitando così la sua azione anti-apoptotica [43].

Recentemente è stata identificata una forma intracellulare di OPN (iOPN) che viene generata a partire da un sito di trascrizione alternativo, a valle di quello canonico, con conseguente perdita del peptide segnale. Il ruolo principale attribuito a iOPN è quello di favorire la polarizzazione delle Th17, inibendo la produzione di IL-27, inibitore di IL-17, da parte delle cellule dendritiche [44].

Ruolo di OPN nell'immunità innata e acquisita

OPN è una proteina largamente espressa nelle cellule del sistema immunitario. I monociti sono caratterizzati da bassi livelli della citochina che però viene costitutivamente espressa in seguito al loro differenziamento in macrofagi. L'espressione macrofagica di OPN può inoltre essere regolata positivamente in seguito a stimolazione con LPS. OPN inoltre è coinvolta nelle diverse funzioni dei macrofagi come migrazione, attivazione, fagocitosi, produzione di citochine pro-infiammatorie e sintesi di ossido nitrico, in risposta a diversi stimoli infiammatori.

OPN è un fattore chemoattrattivo per i neutrofili in quanto favorisce il loro reclutamento nel sito infiammatorio [41]. OPN inoltre è importante per la funzione delle cellule dendritiche (DC): è altamente espressa nelle DC immature e promuove la loro maturazione [45] in seguito alla quale esse migrano nei linfonodi periferici e presentano l'antigene alle cellule T.

È stato dimostrato che le DC attivate da OPN producono a loro volta IL-12 e TNF- α , sostenendo la risposta Th1 [46].

OPN è prodotta dalle cellule T attivate e, come più volte detto, è coinvolta nell'immunità cellulo-mediata in quanto promuove la polarizzazione delle cellule T in cellule Th1 INF- γ secernenti. È stato infatti dimostrato che l'mRNA di OPN è espresso in questo tipo cellulare e non nei Th2 [47]. La forma solubile della proteina potrebbe essere coinvolta nella proliferazione delle cellule T CD4+ e CD8+ e in aggiunta ne promuove la migrazione, dimostrato dal fatto che topi transgenici caratterizzati da una sovra espressione di OPN mostrano una aumentata percentuale di cellule CD4+ nei linfonodi [48]. Inoltre OPN stimola il differenziamento delle cellule T favorendo l'espressione di INF- γ e CD40L nelle cellule T del sangue periferico, con una conseguente induzione dell'espressione di IL-12 da parte dei monociti. In aggiunta l'aumento dell'espressione di CD40L potrebbe spiegare l'abilità di OPN di indurre la proliferazione delle cellule B e la produzione di anticorpi [49].

Ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni.

L'azione pro-infiammatoria di OPN e la sua capacità di polarizzare la risposta Th1, mediante l'abilità di incrementare la produzione di INF- γ da parte delle cellule T e la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, possono in parte spiegare il coinvolgimento di questa proteina nell'autoimmunità [42].

Numerosi studi hanno dimostrato che OPN svolge un ruolo in diverse malattie autoimmuni. Per quanto riguarda la SM, OPN è la citochina maggiormente espressa nelle lesioni cerebrali dei pazienti [50]. Inoltre i livelli proteici sono aumentati nel plasma di pazienti con decorso RR rispetto ai pazienti con decorso progressivo, caratterizzati da livelli proteici simili ai controlli [51].

In aggiunta, topi *SPP1^{-/-}* (*knock-out* per il gene di OPN) sono resistenti alla forma progressiva di encefalite autoimmune sperimentale (EAE), modello animale della SM. La somministrazione di OPN in questi topi induce ricadute più ricorrenti, con peggioramento della paralisi e delle condizioni neurologiche. Inoltre, OPN favorisce la sopravvivenza delle cellule T reattive contro la mielina, dimostrando un ruolo nella comparsa delle esacerbazioni e nella progressione della SM [52].

Anche i Th17 hanno un ruolo nell'induzione e nella patogenesi della SM [53, 54]. Alti livelli di OPN espressi dalle DC aumentano la produzione di IL-17 da parte delle cellule T, sia nel modello animale sia nell'uomo. Questo dimostra che OPN potrebbe essere un mediatore chiave per l'amplificazione della risposta infiammatoria presente nella SM e potrebbe essere coinvolto anche in altre malattie autoimmuni [55].

Numerosi studi genetici sono stati condotti sui polimorfismi presenti nel gene *SPP1*. In particolare nel laboratorio di Immunologia del prof. U. Dianzani, con il quale collaboro, sono stati identificati quattro polimorfismi (+282T>C nell'esone 6: rs4754; +750C>T nell'esone 7: rs11226616; +1083A>G: rs1126772 e +1239A>C: rs9138 nel 3'-UTR) che formano tre diverse combinazioni aplotipiche (aplotipo A: 282T-750C-1083A-1239A; B: 282C-750T-1083A-1239C; C: 282C-750T-1083G-1239C), associate allo sviluppo di diverse malattie autoimmuni [56-60]. I portatori dell'aplotipo B o C hanno un rischio superiore di 1.5 volte di sviluppare la SM [58], il diabete di tipo 1 [59] e il lupus eritematoso sistemico [57] e un rischio superiore di 8 volte di sviluppare la sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) [56], rispetto agli individui omozigoti per l'aplotipo A. Inoltre questi aplotipi influenzano anche i livelli di OPN: gli aplotipi B e C sono associati ad alti livelli di OPN rispetto all'aplotipo A nei pazienti affetti, probabilmente a causa di un aumento della stabilità dell'mRNA che codifica per questi due aplotipi.

Inoltre per quanto riguarda la SM, i pazienti omozigoti per l'aplotipo A hanno una lenta progressione della malattia nella forma SP e sviluppano una malattia più moderata, caratterizzata da una lenta evoluzione della disabilità.

Nella regione del promotore del gene *SPP1* sono stati inoltre identificati 3 polimorfismi -66T>G, -156G>GG e -443T>C, che potrebbero influenzare l'attività trascrizionale del gene [61]. È stato già dimostrato che le variazioni -156G>GG e +1239A>C sono associate allo sviluppo del lupus eritematoso sistemico. In aggiunta gli individui portatori di entrambi gli alleli suscettibili alla malattia hanno un aumentato rischio di sviluppare la malattia [57].

SCOPO DEL LAVORO

1. RUOLO DI OPN NELLA SM

Diversi studi hanno dimostrato che OPN ha un ruolo nella SM. In particolare OPN è la citochina maggiormente espressa nelle lesioni cerebrali dei pazienti [50] e i livelli della proteina sono aumentati nel plasma di pazienti con decorso RR rispetto ai pazienti con forme progressive della malattia e i livelli proteici aumentano durante le esacerbazioni [51]. Da precedenti analisi genetiche condotte sul gene che codifica per OPN è stato dimostrato che i portatori omozigoti per l'aplotipo A (+1239A) hanno un rischio di 1.5 volte più basso di sviluppare la malattia rispetto ai portatori dell'aplotipo B e C (+1239C): inoltre questi individui hanno una lenta progressione della malattia nella forma SP e sviluppano una malattia più moderata, caratterizzata da una lenta evoluzione della disabilità [58].

Lo scopo del mio lavoro è stato quello di analizzare la variazione +1239 A>C e la variazione -156G>GG presenti nel gene di OPN in soggetti affetti da SM. È stato precedentemente dimostrato che queste due variazioni hanno un effetto combinato sul rischio di sviluppo del lupus eritematoso sistemico [58]. Con questa analisi si vuole verificare se questo effetto possa essere presente anche nella SM. Inoltre sarà valutato l'impatto di queste variazioni sull'evoluzione della malattia.

2. RUOLO DI OPN NELLA CIDP

Dati sul ruolo di OPN nelle polineuropatie infiammatorie sono molto scarsi. È stato dimostrato che OPN è costitutivamente espressa nel sistema nervoso periferico e la sua espressione viene regolata positivamente nel modello animale della neurite autoimmune sperimentale (EAN) [62].

Comi e al. hanno dimostrato che la funzione di Fas è difettiva in pazienti affetti da CIDP [28] e l'interazione di OPN con CD44-v6 potrebbe essere coinvolta nell'inibizione dell'apoptosi Fas-mediata [43]. È stato inoltre dimostrato che OPN favorisce la polarizzazione delle cellule Th1 e Th17, coinvolte nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni [42, 44]. Il ruolo delle Th1 e delle Th17 non è ancora del tutto delineato nella patogenesi della CIDP, tuttavia uno studio recente ha dimostrato che la frequenza delle Th17 è più alta nei PBMCs (cellule mononucleate del sangue periferico) e nel CSF di pazienti con una CIDP attiva rispetto ai pazienti in remissione, suggerendo che queste cellule possano essere importanti per l'evoluzione della malattia [62].

Sulla base di queste osservazioni lo scopo del mio lavoro è studiare se OPN può avere un ruolo anche nella CIDP, valutando i livelli plasmatici della proteina mediante un saggio ELISA nei pazienti affetti da CIDP. Successivamente è stata condotta una analisi preliminare della variazione +1239A>C presente nel gene di OPN, per valutare una eventuale associazione con la malattia.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati analizzati 728 pazienti affetti da SM, diagnosticati secondo i criteri di McDonald [3] e 1218 controlli di età ed etnia correlata per la variazione +1239A>C e -156G<GG del gene *SPP1* che codifica per OPN.

Sulla base del decorso clinico i pazienti sono stati definiti come [64]:

- RR: verificarsi di esacerbazioni, ciascuna della durata di almeno 24 ore e separate da almeno un mese di inattività, con recupero totale o sequele (n=447);
- PP: progressivo peggioramento dei sintomi e dei segni clinici dall'insorgenza per almeno 6 mesi, con presenza o meno di ricadute, con stabilizzazioni occasionali e lievi miglioramenti temporanei (n=71);
- SP: iniziale decorso di tipo RR seguito da un progressivo peggioramento dei sintomi e dei segni per almeno 6 mesi, con presenza o meno di ricadute, con lievi remissioni e stabilizzazioni (n=210).

Sono state eseguite delle misurazioni sull'esito:

- il tempo per raggiungere un punteggio >3.0 nella scala EDSS (*expanded disability status scale*) proposta da Kurtzke,
- il tempo per raggiungere un decorso progressivo della malattia.

In accordo con Hawkins e McDonnell [65], la malattia di pazienti che, dopo almeno 10 anni dalla manifestazione, hanno una moderata disabilità (punteggio EDSS \leq 3.0) è definita SM benigna. I pazienti che raggiungono la progressione secondaria entro 10 anni dalla manifestazione sono definiti rapidamente progressivi. I pazienti che non rientrano in questa definizione, sono stati esclusi dallo studio. Nei pazienti con decorso RR, il punteggio di EDSS è stato valutato nella fase di remissione. Il tasso di ricadute annuale prima del trattamento è stato rilevato per 327 pazienti con l'inizio dell'attacco (pazienti RR e SP).

Per quanto riguarda la CIDP, l'analisi della variazione +1239A>C è stata condotta su 53 pazienti.

La diagnosi è stata effettuata seguendo i criteri dell'Accademia Americana di Neurologia (*Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force, 1991*) [20].

Le analisi immunoenzimatiche per la valutazione dei livelli di OPN plasmatica hanno interessato invece un'altra casistica di 25 pazienti confrontati con 20 controlli, secondo la disponibilità del materiale biologico in esame. Il plasma è stato ottenuto in seguito a prelievo di sangue periferico, sottoposto a centrifugazione per 15 minuti a 3000 rpm ed è stato successivamente conservato a -80°C.

I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti previo consenso informato.

Entrambi gli studi sono stati condotti seguendo le linee guida del comitato etico locale.

Saggio ELISA per la valutazione di OPN plasmatica

Per valutare la concentrazione plasmatica di OPN umana nei pazienti e nei controlli è stato utilizzato un saggio ELISA (IBL), in accordo con le indicazioni suggerite dalla ditta produttrice. I campioni sono stati testati in doppio, in due esperimenti separati. La lettura della densità ottica è stata effettuata con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450 nm (SpectraCounter, Bio-Rad).

Estrazione di DNA da sangue

Il DNA utilizzato è stato estratto da campioni di sangue intero eparinato, prelevato dai pazienti o dai soggetti sani. I campioni sono stati sottoposti a lavaggio con aggiunta di una soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) in rapporto 1:2 con il sangue stesso e sono stati centrifugati a 2500 rpm per 20 minuti per eliminare il surnatante. Il lavaggio è stato ripetuto per due volte. In seguito è stato aggiunto il tampone di emolisi (5 mM MgCl₂ esaidrato, 10% NP40) e i campioni sono stati mantenuti in agitazione a temperatura ambiente per 10-15 minuti. I campioni vengono centrifugati a 2500 rpm per 20 minuti. Per rimuovere eventuali residui derivati dall'emolisi è stato effettuato un ulteriore lavaggio con soluzione fisiologica, centrifugando 10 minuti a 1500 rpm. Successivamente è stato aggiunto il tampone di lisi (10 mM TRIS pH 8,2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), SDS 20% (25µL ogni mL di tampone di lisi) e proteinasi K (20 mg/mL ovvero 25 µL per ogni mL di tampone di lisi). I campioni sono stati incubati a 37°C in agitazione per 16 ore. La precipitazione delle proteine, cosiddetta "*salting-out*" è stata effettuata con l'aggiunta di una soluzione di NaCl 6 M. Le proteine precipitate sono state rimosse mediante centrifugazione a 2500 rpm per 20 minuti. Il surnatante è stato recuperato in nuove provette a cui è stato aggiunto un ugual volume di etanolo per la precipitazione del DNA. Il campione è stato mantenuto in agitazione per 10-15 minuti per favorire la precipitazione del DNA, visibile ad occhio nudo. Il DNA è stato prelevato, avendo cura di non frammentarlo, ed è stato lavato con etanolo 70%. Infine il DNA è stato risospeso in TE (10 mM TRIS-HCl pH 7,5 e 1 mM EDTA pH 8). Se durante la fase di recupero, il DNA non è visibile, è possibile far precipitare il DNA mediante ultracentrifugazione: è stato aggiunto etanolo (in rapporto 1:2 rispetto all'etanolo precedentemente utilizzato) e acetato di sodio 3 M (in rapporto 1:10 sul volume totale). Il campione è stato mantenuto a -80°C per due ore. A questo punto è stato centrifugato per 11000 rpm per 45 minuti a 4°C. Successivamente è stato eliminato il surnatante e il DNA depositato sul fondo del tubo è stato risospeso in TE.

Quantificazione spettrofotometrica del DNA

La concentrazione di DNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica con lo strumento Nanodrop™ 2000c (THERMO Scientific).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un volume finale di 25 μL , utilizzando circa 200 ng/ μL di DNA. La miscela di reazione è composta da MgCl_2 3 mM, dal *buffer* di reazione contenente TRIS-HCl 200 mM a pH 8,4 e KCl 500 mM (Invitrogen), da una miscela 0,2 mM di dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen) e da 3,5 U/ μL di *recombinant Taq DNA Polymerase* 5U/ μL (Invitrogen).

Per l'amplificazione della regione 3'-UTR del gene di OPN contenente la variazione nucleotidica +1239A>C (si riferisce al cDNA dove +1 indica il codone di inizio ATG), (SNP ID: rs9138), sufficiente per tipizzare i tre diversi aplotipi, sono stati utilizzati i seguenti *primers* (Sigma):

- **OPN-F:** 5'-gccgtgaattccacagccatg-3'
- **OPN-R:** 5'-ttgaatgtaataagaatttggtgg-3'.

Le condizioni della reazione di PCR sono le seguenti: un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 5', successivamente 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 95°C per 20'', una di appaiamento a 65°C per 20'' e una fase di allungamento a 72°C per 30'', seguiti da un ulteriore ciclo di allungamento a 72°C per 7'. Il frammento amplificato è costituito da 583 bp. Per il sequenziamento automatico è stato invece utilizzato un *primer* interno la cui sequenza è:

- **OPN-seq:** 5'-tgctttatagcaaaatgaaag-3'.

Per l'amplificazione della regione al 5' del gene contenente la variazione nucleotidica -156G>GG (rs7687316) sono stati utilizzati i seguenti primers:

- **Promo-F:** 5'-agccctctcaagcagtcac-3'
- **Promo-R:** 5'-cctgtgttggtggaggatgt-3'.

La PCR è stata però effettuata in condizioni di MgCl_2 2 mM, con una temperatura di appaiamento di 55°C.

Elettroforesi su gel di agarosio

Per visualizzare il prodotto della PCR, è stata effettuata una elettroforesi su gel utilizzando un gel di agarosio 1% in tampone TAE (TRIS-acetato 40 mM pH8 ed EDTA ph 8), contenente GelRed 10000x (Biotium). Una piccola aliquota della reazione di PCR (3 μL) è stata addizionata ad una soluzione contenente 50% vol/vol glicerolo e 0,1% Orange G (Sigma), per favorire il caricamento dei campioni nel gel. Sono stati inoltre utilizzati come riferimento i pesi molecolari *Gene Ruler 1 Kb DNA ladder* (Fermentas). L'esposizione ai raggi UV e la rilevazione della fluorescenza che permette la visualizzazione del DNA, è stata effettuata con lo strumento Gel Doc 1000 (Biorad).

Sequenziamento automatico

I prodotti di PCR sono stati purificati dall'eccesso di *primers* e di nucleotidi utilizzando gli enzimi EXO (Esonucleasi I) e SAP I (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (USB) tramite un ciclo di incubazione di 20 minuti a 37°C e uno di 20 minuti a 80°C.

Le reazioni per il sequenziamento sono state ottenute servendosi del kit specifico *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystem), dotato di dideossinucleotidi marcati con differenti fluorocromi. Seguendo il protocollo fornito dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µL, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µL di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) e il primer (3,2 µM/µL) *forward* o *reverse*.

La reazione di sequenziamento prevede il seguente programma:

- denaturazione a 96°C per 1'
 - denaturazione a 96°C per 10''
 - appaiamento a 50°C per 5''
 - estensione a 60°C per 4'
- } 25 cicli

Il prodotto della reazione è stato ulteriormente purificato mediante il kit *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup* (Montage), seguendo le istruzioni della ditta produttrice. I campioni purificati sono stati addizionati alla formamide, sottoposti a denaturazione per 3 minuti a 95°C e sono stati successivamente caricati sulla piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore (*ABI PRISM 3100 Genetics Analyser*).

Analisi statistica

L'analisi delle frequenze genotipiche e le misurazioni dell'esito sono state comparate applicando il test del χ^2 con la correzione di Yates. Il tasso di ricadute annuo e i dati ottenuti dal saggio ELISA sono stati comparati mediante l'utilizzo del test non parametrico Mann-Whitney U. I valori di P sono stati ottenuti effettuando un test a due code e la significatività statistica corrisponde a $P < 0.05$.

1. RUOLO DI OPN NELLA SM

1.1 Analisi della variazione nucleotidica +1239A<C in pazienti con SM

SNP + 1239		
Genotipi	MS (n=728)	controlli (n=1218)
AA	335 (46)	634 (52)
AC	314 (43)	486 (40)
CC	79 (11)	98 (8)
AA	335 (46)	634 (52)
Non-AA	393 (54)	584 (48)
OR=1.27 P=0.011 (95% CI: 1.05 - 1.54)		

Figura 1.1: Distribuzione delle frequenze genotipiche per la variazione nucleotidica +1239A>C del gene di OPN in pazienti con SM e controlli. Sono indicati il numero dei soggetti e nelle parentesi le proporzioni delle frequenze genotipiche. La distribuzione genotipica rispetta l'equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati). L'analisi statistica è stata effettuata con il test del χ^2 a due code.

Sono stati analizzati 728 pazienti con SM e 1218 controlli per la variazione nucleotidica +1239A<C presente nel 3' UTR del gene che codifica per OPN. È stata osservata questa variazione perché permette di discriminare tra l'aplotipo A (omozigoti per l'allele +1239A) e l'aplotipo non-A (portatori dell'allele +1239C). Da questi dati emerge che la frequenza degli omozigoti per l'allele +1239A è ridotta nei pazienti rispetto ai controlli (46% contro 52%; P=0.011) e questi mostrano un rischio inferiore di 1.27 di sviluppare la malattia rispetto ai portatori dell'allele +1239C.

1.2 Analisi della variazione nucleotidica -156G<GG in pazienti con SM

SNP - 156		
Genotipi	MS (n=728)	controlli (n=912)
GG/GG	78 (10.7)	112 (12.3)
G/GG	304 (41.8)	384 (42.1)
G/G	346 (47.5)	416 (45.6)
OR=0.91 P=0.25 (95% CI: 0.79 - 1.06)		

Figura 1.2: Distribuzione delle frequenze genotipiche per la variazione nucleotidica -156G<GG del gene di OPN in pazienti con SM e controlli. Sono indicati il numero dei soggetti e nelle parentesi le proporzioni delle frequenze genotipiche. La distribuzione genotipica rispetta l'equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati). L'analisi statistica è stata effettuata con il test del χ^2 a due code

La variazione nucleotidica -156G>GG situata nella regione del promotore del gene che codifica per OPN è stata analizzata in 728 pazienti con SM e 912 controlli. L'analisi delle frequenze genotipiche non mostra nessuna differenza significativa tra pazienti e controlli.

1.3 Analisi delle variazioni +1239A>C e -156G<GG nella progressione e nel decorso della SM

	Genotipi					
	+1239A>C		-156G>GG		+1239A>C -156G>GG	
	AA	C	GG/GG	G	AA GG/GG	C G
Rapidamente progressiva	57 (20)	127 (37)	18 (27)	166 (30)	3 (5)	181 (32)
Lentamente progressiva	228 (80)	216 (63)	58 (73)	386 (70)	57 (95)	387 (68)
	P<0.0001		P=0.311		P<0.0001	
SM benigna	110 (38)	84 (24)	36 (46)	158 (28)	35 (52)	159 (28)
SM non benigna	183 (62)	263 (76)	42 (54)	404 (72)	32 (48)	414 (72)
	P=0,001		P=0.0018		P=0.0002	

Figura 1.3: Distribuzione delle frequenze genotipiche sulla base dei diversi esiti della malattia. Nella tabella sono indicati il numero di pazienti nel rispettivo stato della malattia, mentre le proporzioni sono indicate tra parentesi. I pazienti inclusi in questo studio sono i pazienti con decorso RR (lentamente progressivi) o con EDSS \leq 3 (SM benigna dopo 10 anni dalla manifestazione); i pazienti che raggiungono un decorso SP (rapidamente progressivi) o che raggiungono EDSS>3 entro 10 anni dalla manifestazione. I pazienti che hanno un decorso RR e meno di 10 anni di followup (29/728) o decorso PP (71/728) sono stati esclusi dall'analisi di progressione; i pazienti con EDSS \leq 3 e meno di 10 anni di followup (88/728) sono stati esclusi dall'analisi di disabilità. L'analisi statistica è stata effettuata comparando i differenti esiti con il test del χ^2 . L'analisi di progressione è stata effettuata su 628 pazienti: 285 AA, 343 non-AA, 78 GG, 562 non-GG, 60 AAGG, 568 non-AAGG. L'analisi della severità della malattia è stata invece effettuata su 640 pazienti: 293 AA, 347 non-AA, 78 GG, 562 non-GG, 67 AAGG, 573 non-AAGG.

Per stabilire l'impatto delle variazioni +1239A>C e -156G<GG nell'evoluzione della malattia sono state valutate le frequenze genotipiche sulla base della progressione e della severità della malattia. La progressione della malattia è stata valutata comparando i pazienti che passano dalla forma RR alla forma SP entro 10 anni dalla manifestazione della malattia e sono stati definiti rapidamente progressivi (n=184) e quelli che rimangono RR durante i 10 anni (lentamente progressivi, n=444). La severità della malattia è stata invece valutata confrontando i pazienti con punteggio EDSS \leq 3.0 dopo 10 anni dalla manifestazione della malattia (SM benigna, n=194) e quelli che raggiungono un punteggio >3 entro 10 anni (SM non-benigna, n=446).

La frequenza dei pazienti lentamente progressivi è significativamente maggiore negli omozigoti per l'allele +1239A rispetto ai portatori dell'allele +1239C (80% contro 83%; P=0.0001), mentre non è stata osservata alcuna differenza tra gli omozigoti per l'allele -156GG e i portatori per l'allele -156G (73% contro 70%; P=0.3). I pazienti omozigoti per entrambi gli alleli +1239A e -156GG mostrano una frequenza significativamente maggiore di pazienti lentamente progressivi rispetto ai portatori dell'allele +1239C e/o -156G (95% contro 68%; P=0.0001) e agli omozigoti per l'allele +1239A (95% contro 80%; P=0.0094).

Inoltre le proporzioni dei pazienti con SM benigna sono significativamente maggiori negli omozigoti +1239A rispetto ai portatori +1239C (38% contro 24%; P=0.0001) e negli omozigoti per -156GG rispetto ai portatori -156G (46% contro 28%; P=0.0018). I pazienti omozigoti per entrambi

(+1239A e -156GG) mostrano una proporzione più alta di pazienti con SM benigna rispetto ai portatori +1239C e/o -156G e agli omozigoti per +1239A in modo statisticamente significativo (52% contro 38%; P=0.038).

1.4 Impatto clinico delle variazioni +1239A<C e -156G<GG sulle esacerbazioni della SM

	Genotipi					
	AA N=153	C N=174	GG/GG N=33	Non-GG N=294	AAGG N=26	CG N=301
Tasso di ricadute	0.5 (0.2-1)	1.3 (0.6-1.7)	0.8 (0.4-1.2)	1.1 (0.5-1.3)	0.6 (0.2-1.3)	1.2 (0.5-1.5)
	P=0.01		P=0.09		P=0.06	

Figura 1.4: Tasso di ricadute in pazienti con l'inizio dell'attacco con diversi genotipi del gene di OPN. I numeri indicano la media annua di ricadute. L'analisi statistica è stata effettuata con test Mann-Whitney U a due code.

Per valutare l'impatto clinico di queste variazioni, è stato analizzato il tasso di ricadute annuo in pazienti con diversi genotipi all'inizio degli attacchi. L'analisi è stata effettuata sui 327 pazienti (153 AA, 174 non-AA) di cui erano disponibili i dati clinici. Il tasso di ricadute è significativamente più basso nei pazienti omozigoti per +1239A rispetto ai portatori dell'allele +1239C (0.5/anno contro 1.3 anno; P=0.01), mentre non sono state evidenziate differenze significative tra gli omozigoti -156GG e i portatori -156G (0.8/anno contro 1.1/anno; P=0.09) o tra i soggetti con entrambi i genotipi protettivi e quelli che portano almeno un allele predisponente (0.6/anno contro 1.2/anno; P=0.06).

2. RUOLO DI OPN NELLA CIDP

2.1 Valutazione dei livelli plasmatici di OPN in pazienti con CIDP

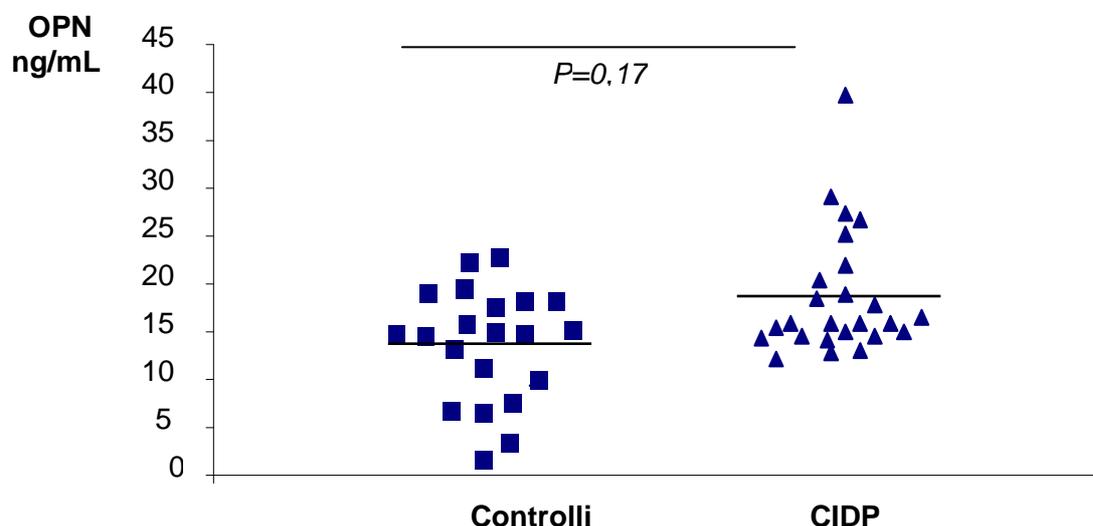


Figura 2.1: Dosaggio dei livelli plasmatici di OPN nel plasma di pazienti con CIDP (n=25) e nei controlli (n=20). Le linee indicano la concentrazione media per ogni gruppo (137.5 ng/mL per i controlli e 178.2 ng/mL per i pazienti). L'analisi statistica è stata effettuata con il test Mann-Whitney a due code.

È stato effettuato un saggio ELISA per OPN umana su campioni di plasma prelevati da 25 pazienti con CIDP confrontati con 20 controlli.

I dati mostrano che i livelli plasmatici della proteina sono più elevati nei pazienti rispetto ai controlli (media CIDP: 178.2 ng/mL; controlli: 137.5 ng/mL), anche se la differenza non è statisticamente significativa (P=0.17).

2.2 Analisi della variazione nucleotidica +1239 A>C in pazienti con CIDP

Genotipi	SNP + 1239	
	CIDP (n=53)	controlli (n=1218)
AA	25 (47)	634 (52)
AC	22 (42)	486 (40)
CC	6 (11)	98 (8)
AA	25 (47)	634 (52)
Non-AA	28 (53)	584 (48)

OR=1.22 P=0.57 (95% CI: 0.68 - 2.18)

Figura 22: Distribuzione delle frequenze genotipiche per la variazione nucleotidica +1239 A>C del gene di OPN in pazienti con CIDP e controlli. Sono indicati il numero dei soggetti e tra parentesi le proporzioni delle frequenze genotipiche. La distribuzione genotipica rispetta l'equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati). L'analisi statistica è stata effettuata con il test del χ^2 a due code.

La variazione nucleotidica +1239 A>C, localizzata nel 3' UTR del gene OPN è stata analizzata anche in 53 pazienti con CIDP.

La frequenza degli individui omozigoti per l'allele +1239A è inferiore nei pazienti con CIDP rispetto ai controlli (47% contro 52%) e mostrano un rischio inferiore di 1.22 di sviluppare la malattia rispetto ai portatori dell'allele +1239C, anche se non si raggiunge la significatività statistica (P=0.57).

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

OPN è una citochina coinvolta nell'autoimmunità. È stato dimostrato che alcune variazioni del gene di OPN sono associate a diverse malattie autoimmuni [56-60]. In particolare Chiocchetti e al. [58] hanno dimostrato che gli omozigoti per la variazione +1239A presente nel 3' UTR del gene di OPN ha un effetto protettivo nello sviluppo e nell'evoluzione della SM. Questo genotipo infatti ha un rischio inferiore di 1.56 volte di sviluppare la malattia. Inoltre D'Alfonso e al. [57] hanno dimostrato che le variazioni +1239C e -156G hanno un effetto combinato sullo sviluppo del lusus eritematoso sistemico. In questo contesto l'analisi è stata estesa in pazienti con SM, anche tenendo conto delle conoscenze emerse dal precedente lavoro sulla SM. I risultati da me ottenuti mostrano che i gli omozigoti per l'allele +1239A hanno un rischio inferiore di 1.27 di sviluppare la SM rispetto ai portatori dell'allele +1239C e di conseguenza hanno una lieve protezione nei confronti della malattia. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti precedentemente anche se il rischio risulta inferiore, probabilmente a causa del fatto che la casistica è stata ampliata e a causa delle differenze interindividuali presenti nelle due casistiche.

L'analisi della variazione -156G<GG non ha invece evidenziato differenze statisticamente significative tra i pazienti e i controlli (OR=0.91; P=0.25), indicando che questa variazione non è associata allo sviluppo della malattia.

Successivamente è stato valutato l'impatto di queste variazioni nel decorso della malattia. I dati ottenuti confermano la correlazione tra la variazione +1239A>C e la progressione della malattia. In aggiunta gli omozigoti per l'allele +1239A mostrano un tasso di ricadute annuo inferiore rispetto agli altri pazienti.

I pazienti omozigoti per entrambe le variazioni +1239A e -156GG hanno una malattia più moderata con una lenta progressione della disabilità e un lento passaggio alla forma SP rispetto ai pazienti portatori di +1239C e/o -156G e agli omozigoti per l'allele +1239A.

In conclusione la variazione -156GG in omozigosi presente nel 5' del gene di OPN conferisce una ulteriore protezione per lo sviluppo della SM, soprattutto nei pazienti portatori del genotipo protettivo (omozigoti per +1239°) al 3' UTR del gene. Questi dati confermano che il gene di OPN potrebbe avere un ruolo nello sviluppo e nella progressione della SM.

Nella seconda parte della relazione sono stati riportati i dati preliminari di uno studio volto a identificare il ruolo di OPN nella CIDP, malattia caratterizzata da un attacco autoimmune al sistema nervoso periferico. Inizialmente è stata valutata la concentrazione di plasmatica di OPN che risulta

essere più elevata nei pazienti rispetto ai controlli, anche se questo dato non raggiunge la significatività statistica.

Successivamente è stata analizzata la variazione +1239A>C del gene di OPN in 53 pazienti affetti da CIDP. L'analisi delle frequenze genotipiche dimostra che i portatori dell'allele +1239A sono inferiori nei pazienti rispetto ai controlli (47% contro 52%) e mostrano un rischio inferiore di 1,22 di sviluppare la malattia rispetto ai portatori dell'allele +1239C, anche se non si raggiunge la significatività statistica ($p=0.57$). Nonostante ciò, la loro frequenza è molto simile a quella riscontrata precedentemente in pazienti affetti da SM (soggetti AA: 46% SM contro 47% CIDP).

I dati qui ottenuti dimostrano che i portatori dell'allele +1239A potrebbero avere una protezione per lo sviluppo della CIDP e insieme al fatto che i livelli della proteina sono maggiori nei pazienti rispetto ai controlli, OPN potrebbe avere un ruolo in questa malattia.

In futuro vogliamo aumentare i soggetti inclusi nello studio e vorremmo analizzare meglio se la presenza di queste variazioni possa influenzare i livelli plasmatici della proteina. È stato dimostrato che i portatori dell'aplotipo B e C mostrano alti livelli di OPN rispetto all'aplotipo A in diverse malattie autoimmuni, tra le quali anche la SM [58]. Vogliamo valutare se l'aumento di OPN che abbiamo osservato nei pazienti con CIDP è dovuto a una maggiore frequenza degli aplotipi B e C o semplicemente alla presenza di infiammazione. Questa analisi non è stata eseguita perché non erano disponibili i plasmi dei soggetti utilizzati nell'analisi genetica e quindi non è stato possibile correlare la frequenza allelica con la concentrazione plasmatica di OPN negli stessi soggetti.

In aggiunta vorremmo analizzare se la frequenza allelica possa influenzare la progressione della malattia osservando le diverse frequenze nelle diverse forme cliniche della malattia, in modo simile allo studio che è stato condotto per la SM.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] Compston A., Coles A. **Multiple sclerosis.** Lancet 2008 ; 372: 1502-1517. Review
- [2] Hauser S. L., Oksenberg J. R. **The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation and neurodegeneration.** Neuron 2006 ;52: 61-76.
- [3] Polman C.H., Reingold S.C., Banwel B. et al. **Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.** Annals of Neurology 2011; 69(2): 292-302.
- [4] Barten L. J., Allington D. R., Procacci K.A., Rivery M.P. **New approaches in the management of multiple sclerosis.** Drug Design Development and Therapy 2010; 4: 343-366.
- [5] Comabella S, Khoury SJ. **Immunopathogenesis of multiple sclerosis.** Clin Immunol 2012; 142(1):2-8. Review
- [6] Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, A. et al. **A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.** N. Engl. J. Med. 2006; 354: 899–910.
- [7] Waubant E, Goodkin DE, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Stewart T, Andersson BP, Stabler G, Miller K. **Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis.** Neurology 1999; 7: 1397–1401.
- [8] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. **Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis.** Am. J. Pathol. 2008; 172: 146–155.
- [9] Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. **Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis.** Brain. 2009; 132 : 3329–3341.
- [10] Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. **Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** J. Exp. Med. 2004; 199: 971–979.
- [11] Johnson AJ, Suidan GL, McDole J, Pirko I. **The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology?** Int. Rev. Neurobiol. 2007; 79: 73–97.
- [12] Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. **A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis.** J. Exp. Med. 2001; 194: 669–676.
- [13] Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. **Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation.** Brain. 2000; 123: 1174–1183.
- [14] Link H, Huang YM. **Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.** J. Neuroimmunol. 2007; 180: 17–28.
- [15] O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, Moore NH, Warren KG, Wong SJ, Hafler DA, Wucherpfennig KW. **Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein.** J. Immunol. 2005; 175: 1974–1982.
- [16] Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. **Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability.** Curr. Opin. Neurol. 1999; 12: 295–302.
- [17] Frohman EM, Filippi M, Stuve O, Waxman SG, Corboy J, Phillips JT, Lucchinetti C, Wilken J, Karandikar N, Hemmer B, Monson N, De Keyser J, Hartung H, Steinman L, Oksenberg JR, Cree BA, Hauser S, Rucke MK. **Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions.** Arch. Neurol. 2005; 62: 1345–1356.

- [18] Köller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung HP. **Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.** N Eng J Med. 2005; 352(13):1343-56. Review.
- [19] Barohn RJ, Kissel JT, Warmolts JR, Mendell JR. **Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: clinical characteristics, course and recommendations for diagnostic criteria.** Arch Neurol. 1989; 46: 878-84.
- [20] **Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP): report from an ad hoc subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force.** Neurology. 1991;41: 617-8.
- [21] Vallat JM, Sommer C, Magy L. **Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition.** Lancet Neurol. 2010; 9(4): 402-12. Review.
- [22] Chiò A, Cocito D, Bottacchi E, Buffa C, Leone M, Plano F, et al. **Idiopathic chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an epidemiological study in Italy.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007; 78: 1349-53.
- [23] Winer J, Hughes S, Cooper J, Ben-Smith A, Savage C. **Gamma delta T cells infiltrating nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy.** J Neurol. 2002; 249: 616-21.
- [24] Hartung HP, Reiners K, Schmidt B, Stoll G, Toyka KV. **Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis.** Ann Neurol. 1991;30: 48-53.
- [25] Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Hattori T. **Serum levels of tumor necrosis factor alpha in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.** Neurology. 2001; 56: 666-69.
- [26] Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. **Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin and relocated ZO-1.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75: 765-69.
- [27] Van Rhijn I, Van den Berg LH, Bosboom WM, Otten HG, Logtenberg T. **Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy.** Brain. 2000; 123: 2020-29.
- [28] Comi C, Gaviani P, Leone M, et al. **Fas-mediated T-cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.** J Peripher Nerv Syst. 2006; 11: 53-60.
- [29] Comi C, Osio M, Ferretti M, Mesturini R, Cappellano G, Chiochetti A, Carecchio Miryam, et al **Defective Fas mediated T cell apoptosis predicts acute onset CIDP.** J Peripher Nerv Syst. 2009; 14: 101-106.
- [30] Chi LJ, Wang HB, Wang WZ. **Impairment of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.** J Periph Nerv Syst. 2008; 13: 54-63.
- [31] Notturmo F, Pace M, De Angelis MV, Caporale CM, Giovannini A, Uncini A. **Susceptibility to chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy is associated to polymorphic GA repeat in the SH2D2A gene.** J Neuroimmunol. 2008; 197: 124-27.
- [32] Kiefer R, Dangond F, Mueller M, Toyka KV, Hafler DA, Hartung HP. **Enhanced B7 costimulatory molecule expression in inflammatory human sural nerve biopsies.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000; 69: 362-68.
- [33] Murata K, Dalakas MC. **Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.** Brain. 2000; 123: 1660-66.
- [34] Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, et al. **Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice.** J Exp Med. 2001;194:677-84.
- [35] Hu W, Janke A, Ortler S, et al. **Expression of CD28-related costimulatory molecule and its ligand in inflammatory neuropathies.** Neurology. 2007;68:277-82.
- [36] Sommer C, Koch S, Lammens M, Gabreels-Festen A, Stoll G, Toyka KV. **Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP.** Neurology. 2005; 65: 1924-29.

- [37] Kawasaki T, Oka N, Akiguchi I, Miyamoto K, Kaji R, Shibasaki H. **Up-regulation of cyclooxygenase-2 in inflammatory demyelinating neuropathy.** *Acta Neuropathol.* 2001; 101: 154–58.
- [38] Yan WX, Archelos JJ, Hartung HP, Pollard JD. **P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.** *Ann Neurol.* 2001; 50: 286–92.
- [39] Kim HJ, Jung CG, Jensen MA, Dukala D, Soliven B. **Targeting of myelin protein zero in a spontaneous autoimmune polyneuropathy.** *J Immunol.* 2008; 181: 8753–60.
- [40] Sanvito L, Makowska A, Mahdi-Rogers M, et al. **Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80:333–38.
- [41] Wang KX, Denhardt DT. **Osteopontin: role in immune regulation and stress responses.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008; 19(5-6): 333-45. Review.
- [42] Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. **Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity.** *Science.* 2000; 287: 860–4.
- [43] Mielgo A, van Driel M, Bloem A, Landmann L, Gunthert U. **A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms.** *Cell Death Differ* 2006; 13: 465–77.
- [44] Shinohara ML, Kim HJ, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. **Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7235–9.
- [45] Kawamura K, Iyonaga K, Ichiyasu H, Nagano J, Suga M, Sasaki Y. **Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 206–12.
- [46] Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, et al. **Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype.** *Blood.* 2005;106:946–55.
- [47] Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T, et al. **Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells.** *Int Immunol* 2001;13: 367–76.
- [48] Higuchi Y, Tamura Y, Uchida T, Matsuura K, Hijiya N, Yamamoto S. **The roles of soluble osteopontin using osteopontin-transgenic mice in vivo: proliferation of CD4+ T lymphocytes and the enhancement of cell-mediated immune responses.** *Pathobiology* 2004; 71: 1–11.
- [49] O'Regan A, Hayden JM, Berman JS. **Osteopontin augments CD3-mediated interferon-g and CD40 ligand expression by T cells which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells.** *J Leukoc Biol* 2000; 68: 495–502.
- [50] Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, et al. **The influence of the pro-inflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.** *Science* 2001; 294: 1731–5.
- [51] Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. **Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis.** *Ann Neurol* 2003; 53: 819–22.
- [52] Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. **Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells.** *Nat Immunol* 2007;8:74–83.
- [53] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T et al. **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.** *Nature* 2003. 421: 744–748.
- [54] Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L et al. **Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis.** *J. Clin. Invest* 2006. 116: 1317–1326.

- [55] Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. **Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis.** *J Immunol.* 2008; 181(11):7480-8.
- [56] Chiocchetti, A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacopelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. **High levels of Osteopontin associated to polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation.** *Blood* 2004; 103, 1376–1382.
- [57] D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacopelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P. **Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2005; 52: 539-547.
- [58] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U. **Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression.** *J Neuroimmunol* 2005; 163: 172-178
- [59] Chiocchetti A, Orilieri E, Cappellano G, Barizzone N, D'Alfonso S, D'Annunzio G, Lorini R, Ravazzolo R, Cadario F, Martinetti M, Calcaterra V, Cerutti F, Bruno G, Larizza D, Dianzani U. **The osteopontin gene +1239A/C single nucleotide polymorphism is associated with type 1 diabetes mellitus in the Italian population.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23:263-269.
- [60] Barizzone N, Marchini M, Cappiello F, Chiocchetti A, Orilieri E, Ferrante D, Corrado L, Mellone S, Scorza R, Dianzani U, D'Alfonso S. **Association of osteopontin regulatory polymorphisms with systemic sclerosis.** *Hum Immunol* 2011; 72: 930-934.
- [61] Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A et al. **Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity.** *Physiological Genomics.* 2005; 20: 87–96.
- [62] Ahn M, Lee Y, Moon C, Jin JK, Matsumoto Y, Koh CS, Kim HM, Shin T. **Upregulation of osteopontin in Schwann cells of the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis.** *Neuroscience Letters* 2004; 372: 137–141.
- [63] Chi LJ, XU WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. **Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.** *J Periphe Nerv Syst* 2010;15(4):345-56.
- [64] Lublin FD and Reingold SC. **Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey.** *Neurology.* 1996; 46 (4): 907-911.
- [65] Hawkins SA and McDonnell GV. **Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors.** *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.* 1999; 67(2):148–152.

ATTIVITÀ FORMATIVA SVOLTA DURANTE L'ANNO DI DOTTORATO:

-CORSO DI CITOFLUORIMETRIA organizzato dalla Becton Dickinson
1-2 marzo 2012 parte teorica presso la BD (Buccinasco, MI)
30 marzo 2012 parte pratica (in Dipartimento)

-CORSO DI INGLESE MEDICO-SCIENTIFICO organizzato dalla ABES SCHOOL (Novara)
Ogni venerdì dal 7 maggio al 28 settembre 2012 (escluso il mese di agosto)

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE E AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE A.A. 2011 – 2012 :

- 20 dicembre 2011

Galectins-carbohydrate binding protein: sweet or sour?
Prof. Mauro PERRETTI

- 13 gennaio 2012

Hepatocellular carcinoma, novel avances from genomics to treatment
Dr. Rohini SHARMA

- 25 gennaio 2012

Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics
Dr. Paolo FORTINA

- 8 marzo 2012

Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion
Dott.ssa Elena RAINERO

- 22 marzo 2012

Molecular classification of multiple myeloma
Prof. Antonino NERI

- 23 marzo 2012

Role of Diacylglycerol Kinases in the control of T cell activation and differentiation programs
Prof.ssa Isabel MERIDA

- 29 marzo 2012

The role of cutaneous HPV in skin cancer
Prof. Ingo NINDL

- 16 aprile 2012

Human neural stem cell-mediated therapy of neurodegenerative diseases
PhD. Lidia De Filippis

- 15 maggio 2012

Microparticles as novel effectors in Inflammation
Prof. Mauro PERRETTI

- 16 maggio 2012

Resolvins and Omega-3 in Inflammation
Prof. Mauro PERRETTI

- 15 giugno 2012

High-throughput Biochemical Target Investigation unveils a novel function of miR-21 as a negative modulator of signal transduction in T-lymphocytes.
Prof. Pino MACINO

- 19 – 20 luglio 2012 ciclo di lezioni:

Neuronal death: recruitment of programmed necrosis and autophagy

19 luglio 2012: *Brain, brain quite contrary how do you neurones die? Programmed cell death*

20 luglio 2012: *Oxidative stress and recruitment of autophagy to brain cell death*

Prof. Philip BEART

-CORSO DI Genetics and molecular medicine

Prof ELLIS

Dal 21 maggio al 1 giugno 2012

Journal Club interni ai dipartimenti

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:

congresso nazionale:

XXII AINI (associazione italiana di neuro immunologia) CONGRESS

Dal 26 al 29 settembre 2012

NH Hotel Parco degli Aragonesi Catania

PUBBLICAZIONI:

Comi C, Cappellano G, Chiocchetti A, Orilieri E, **Buttini S**, Ghezzi L, Galimberti D, Guerini F, Barizzone N, Perla F, Leone M, D'Alfonso S, Caputo D, Scarpini E, Cantello R, Dianzani U.

The impact of osteopontin gene variations on multiple sclerosis development and progression.

Clin Dev Immunol 2012 ; 212893.