

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze Mediche



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXVI (2010-2013)

EFFETTI DI UN TRATTAMENTO CON ANTICORPO MONOCLONALE

NEUTRALIZZANTE L'IL-17 IN TOPI MRL/LPR

ELEVATI LIVELLI DI suPAR IN PAZIENTI CON AUTOIMMUNITA' E

LINFOPROLIFERAZIONE

Candidato: Nausicaa Clemente

Tutor e Relatore: Prof. Umberto Dianzani

INDICE

INTRODUZIONE

- 1. Le difese immunitarie**
- 2. L' autoimmunità**
- 3. La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS)**
 - 3.1** Epidemiologia
 - 3.2** Fattori immunologici
 - 3.3** Patogenesi
 - 3.4** I modelli animali dell' ALPS: topi *lpr* e *gld*
 - 3.5** Classificazione
- 4. L'interleuchina 17 (IL-17)**
 - 4.1** Struttura e meccanismo d'azione
 - 4.2** Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione
- 5. Il recettore del plasminogeno attivato di tipo urochinasi (uPAR)**
 - 5.1** Struttura e meccanismo d'azione
 - 5.2** Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione

SCOPO GENERALE DELLA TESI

MATERIALI E METODI

RISULTATI

DISCUSSIONE

PROSPETTIVE FUTURE

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

1. Le difese immunitarie

Le difese immunitarie si articolano in una risposta precoce detta infiammazione, che utilizza meccanismi effettori relativamente aspecifici ma subito pronti all'uso, e in una risposta tardiva detta immunità adattativa, che utilizza meccanismi effettori molto specifici che richiedono giorni per essere attivati.

Le cellule chiave dell'infiammazione sono i granulociti e i macrofagi, che eliminano gli agenti infettivi principalmente tramite la fagocitosi e cooperano con fattori umorali tra cui spicca il sistema del complemento e quello delle metalloproteinasi (MMP). Le cellule chiave della risposta immunitaria adattativa sono i linfociti che possono agire direttamente contro l'agente estraneo (linfociti T) oppure attraverso la produzione di anticorpi (linfociti B). Ciascun linfocita riconosce una molecola (detta antigene) di uno specifico agente infettivo attraverso uno specifico recettore per l'antigene, detto *T Cell Receptor* (TCR) per i linfociti T e anticorpo per i linfociti B. Gli anticorpi riconoscono gli antigeni in forma nativa e possono essere secreti in forma solubile. I linfociti T riconoscono l'antigene (in genere una proteina) solo dopo che è stato processato e presentato su molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I o di classe II da parte di una cellula presentante l'antigene (APC), ovvero un macrofago, una cellula dendritica o un linfocita B. Dopo aver riconosciuto l'antigene, i linfociti provvedono alla sua eliminazione per lo più indirizzando selettivamente contro l'agente infettivo i sistemi effettori dell'infiammazione. I linfociti T comprendono linfociti T citotossici, capaci di uccidere le cellule infettate da virus o cellule neoplastiche, e i linfociti T helper (Th) capaci di produrre citochine che indirizzano la risposta immunitaria e infiammatoria. A seconda delle citochine prodotte i Th possono differenziare in diverse popolazioni effettrici, quali i Th1 caratterizzati dalla produzione di interferon (IFN)- γ e *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- β che sostengono l'infiammazione mediata da macrofagi, i Th2 che producono citochine in grado di sostenere la risposta anticorpale come IL-4 e IL-5 (IL è l'acronimo di interleuchina), e i Th17 che producono IL-17 e sostengono l'infiammazione mediata da granulociti. Altri Th sono i T regolatori (Treg) che producono IL-10 e *Transforming Growth Factor* (TGF- β) i quali sono capaci di sopprimere la risposta immunitaria e infiammatoria.

Infiammazione e risposta adattativa sono cruciali per difenderci dagli agenti infettivi, tuttavia possono anche essere esse stesse causa di malattia, quando sono attivate in modo inappropriato.

2. L'autoimmunità

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich propose che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei producendo danni tissutali (*"horrors autotopicus"*).

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Ciò conduce allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno chiamato autoimmunità. Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani.

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. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono gli agenti infettivi. 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 "reazione crociata" contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest'ultimo è stato eliminato;
- 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 iper-reattivo permetterà l'attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente silente.

I meccanismi appena descritti non sono mutualmente esclusivi, ma intervengono insieme e probabilmente ciò determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading*, molto frequente nelle malattie autoimmuni. Infatti nel corso della malattia, si passa da una fase iniziale, dove la risposta immune è diretta verso un singolo epitopo di una proteina *self*, ad una risposta autoimmune più vasta

[Digitare il testo]

indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia verso proteine diverse (espansione epitopica).

Le malattie autoimmuni colpiscono il 5-10% della popolazione dei paesi occidentali. Sono il prodotto di un'attivazione dei linfociti T o B contro antigeni *self* in assenza di una causa documentabile.

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 SM (sclerosi multipla) 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 diretti contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi diretti contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Esistono poi alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'antigene bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi diretti contro il recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi diretti 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].

3. La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS)

3.1 Epidemiologia

La “sindrome autoimmune linfoproliferativa” (ALPS-OMIM#601859), è una malattia autoimmune dell’infanzia originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith [2]. Rappresenta una condizione rara, osservata in individui di entrambi i sessi e razze diverse, sulla cui incidenza ancora oggi non esistono stime definitive. Infatti, soltanto negli ultimi anni si è giunti ad una accurata definizione delle basi molecolari e del fenotipo clinico di quest’affezione.

I tratti principali dei pazienti con ALPS sono la linfoproliferazione che si manifesta con linfoadenomegalia e splenomegalia massive, con un aumentato rischio di sviluppare linfomi nell’età adulta (che colpiscono la linea linfoide B) ed il frequente sviluppo di manifestazioni autoimmuni associate a citopenie, espansione periferica di linfociti DN e ridotta funzionalità del sistema Fas/FasL. Tali molecole sono interruttori di morte responsabili della morte per apoptosi dei linfociti [3-6]. Alla base dell’ALPS vi è quindi un disordine dell’omeostasi linfocitaria e della tolleranza periferica causate dall’accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, milza e nei linfonodi di cloni linfocitari e dall’espansione di linfociti T TCR $\alpha\beta$ -positivi e DN per CD4 e CD8, e da autoimmunità [5-7]. Si pensa che i linfociti T DN possano originare da linfociti T attivati “esausti” i quali non vanno incontro a morte cellulare programmata in seguito alla riattivazione da parte del loro TCR o all’ingaggio da parte di FasL. Negli anni numerosi studi hanno individuato altri difetti in grado di contribuire al difetto apoptotico e alla malattia. Per tale ragione si è resa necessaria una revisione dei criteri diagnostici e uno studio del 2010 [8] propone tra i parametri da considerare diagnostici quali: la presenza di linfociti T TCR $\alpha\beta$ -positivi e DN per CD4 e CD8 contestualmente all’aumento, nel siero e nel plasma dei pazienti, dei livelli IL-10, o IL-18, o Fas ligando solubile (sFas-L) o vitamina B12. Nell’uomo il difetto apoptotico viene valutato “in vitro” mediante l’analisi funzionale della sensibilità di linfociti T all’apoptosi indotta da Fas e completa il sospetto clinico e l’aumento dei linfociti DN [9].

L’unico trattamento farmacologico per l’ALPS è la somministrazione di corticosteroidi o altri immunosoppressori anche se, a lungo termine, sono molteplici gli effetti collaterali.

3.2 Fattori immunologici

Il difetto immunitario principale dei pazienti con ALPS sembra tuttavia essere il difetto funzionale del recettore di morte Fas. A questo difetto, che ha basi genetiche, si attribuisce un ruolo causale nello sviluppo della malattia [10;11].

[Digitare il testo]

Studi immunologici hanno dimostrato che i pazienti con ALPS, presentano una risposta preferenziale di tipo Th2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- γ e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1, favorendo indirettamente la linea Th2 e la crescita di linfociti B con successiva produzione di autoanticorpi [12].

3.3 Patogenesi

E' ormai conoscenza radicata che l'apoptosi può essere indotta attraverso differenti stimoli, quali esposizione a radiazioni ionizzanti, composti chimici o farmaci, privazione di fattori di crescita o attivazione di recettori altamente specializzati, denominati recettori di morte o, in lingua anglosassone, *death receptors*. I *death receptors* costituiscono un sottogruppo della superfamiglia dei recettori del *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Questi recettori partecipano a differenti tappe di controllo dello sviluppo e della regolazione del sistema immunitario e la loro attivazione conduce ad alcuni processi cellulari che si realizzano nel contesto della proliferazione, della sopravvivenza e della differenziazione cellulare, oltre che dell'apoptosi. Tra i 26 membri che compongono questa superfamiglia, otto di essi contengono un dominio intracitoplasmatico, denominato *Death Domain* (DD), indispensabile per l'attivazione delle caspasi, via del segnale che conduce all'apoptosi. Nell'ambito del sottogruppo dei *death receptors*, il recettore Fas riveste un ruolo essenziale nell'eziopatogenesi dell'ALPS. Brevemente, in seguito all'interazione del recettore di membrana Fas e il suo ligando, denominato Fas-ligando (Fas-L), si realizzano delle modificazioni strutturali a carico del DD che consentono a quest'ultimo di interagire con il medesimo dominio presente in altri recettori vicini, la successiva trimerizzazione di Fas a livello della membrana cellulare e la sua internalizzazione attraverso un meccanismo di endocitosi. Quest'ultima fase rappresenta un passaggio critico [13] per la successiva formazione ottimale di un complesso intracellulare multimolecolare denominato *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) [14]. Questo complesso è formato da una molecola adattatrice, FADD (*Fas-Associating protein with Death Domain o MORT-1*), capace di interagire, attraverso la sua porzione C-terminale, con il DD di Fas. FADD inoltre contiene un secondo dominio d'interazione proteico, denominato *Death Effector Domain* (DED) [15], che consente il reclutamento delle molecole procaspasi-8, procaspasi-10 e FLIP [16]. Le procaspasi-8 e -10 sono delle cisteinproteasi appartenenti alla famiglia delle caspasi, generalmente presenti nel citoplasma sotto forma di proenzimi, le quali, attraverso sequenziali clivaggi proteolitici, possono auto attivarsi nel contesto del DISC [17] ed indurre l'apoptosi. L'attivazione della caspasi 8 effettrice innesca una cascata proteolitica attivatoria indotta dalla caspasi 8, che coinvolge la caspasi 10, è in grado di attivare le caspasi esecutrici 3, 7 e 6 [17;18]. La molecola FLIP, invece,

[Digitare il testo]

svolge un ruolo regolatore: stabilizza il DISC e può anche inibire l'attivazione delle procaspasi [19;20].

3.4 I modelli animali dell' ALPS: topi *lpr* e *gld*

Il modello animale dell'ALPS sostiene l'ipotesi che la malattia sia dipendente dalla funzionalità di Fas. Infatti è rappresentato dai topi MRL *lpr* e *gld*, portatori di una mutazione "loss of function" in omozigosi, rispettivamente nei geni di Fas e FasL. Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da: linfadenopatia, splenomegalia, autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite, espansione policlonale in periferia di linfociti T.

La tipica mutazione *lpr* è causata da un difetto di *splicing* e determina una ridotta espressione del recettore in membrana, mentre una variante della mutazione, la forma *lpr^{cg}* è una mutazione puntiforme nel DD del recettore Fas che ne riduce l'attività. La mutazione *gld* è invece una mutazione puntiforme nel dominio C-terminale di FasL che ne riduce la capacità di interagire con Fas [21].

Come nell'uomo, anche nel topo il *background* genetico sembra influenzare la penetranza di queste mutazioni, in quanto la malattia si manifesta in modo molto grave nel ceppo murino MRL, mentre il quadro risulta molto più lieve nel ceppo Balb/C [4;22].

3.5 Classificazione

Recentemente, in seguito alla revisione diagnostica [8], stata proposta una nuova classificazione dei pazienti affetti da ALPS, in base al difetto genetico causale:

<u>Nomenclatura precedente</u>	<u>Nomenclatura rivisitata</u>	<u>Gene coinvolto</u>	<u>Definizione</u>
ALPS Tipo 0	ALPS-FAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione omozigote germinale in Fas
ALPS Tipo Ia	ALPS-FAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione eterozigote germinale in Fas
ALPS Tipo Im	ALPS-sFAS	FAS	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione somatica in Fas
ALPS Tipo Ib	ALPS-FASLG	FASLG	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione germinale in Fas-Ligando

[Digitare il testo]

ALPS TIPO IIa	ALPS-CASP10	CASP 10	Pazienti che soddisfano i criteri diagnostici dell'ALPS e hanno una mutazione germinale in Caspasi 10
ALPS Tipo III	ALPS - U	Sconosciuto	Pazienti che rispettano i criteri diagnostici dell'ALPS; comunque i difetti genetici sono indeterminati (no sono presenti difetti in Fas, Fas-L o Caspasi 10)

Tabella 1. Classificazione rivisitata di pazienti ALPS, anno 2010 [8].

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

L'ALPS quindi sembra presentare un quadro oligogenico e multifattoriale. Infatti, tra i pazienti esiste una grande variabilità clinica, non solo tra quelli con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione. Spesso la malattia è legata a mutazioni eterozigoti con dominanza incompleta e il genitore portatore della mutazione è in genere sano [23]. L'espressione della malattia può dipendere dalla co-presenza di altri fattori predisponenti di tipo genetico o ambientale [24].

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

Dal punto di vista dei fattori predisponenti genetici abbiamo in passato dimostrato un ruolo a carico di varianti del gene di OPN e di perforina. In entrambi i casi le varianti geniche predisponenti agirebbero rallentando lo spegnimento della risposta immunitaria [25;26].

4. L'interleuchina 17 (IL-17)

IL-17 è prodotta da linfociti T chiamati T-helper 17 (Th17); questa popolazione di linfociti T appartiene alla classe dei linfociti CD4⁺, ed è anch'essa implicata nel processo infiammatorio.

Le cellule Th17 sono state identificate come un unico sottoinsieme di cellule che si sviluppa lungo percorsi distinti da quelli seguiti per differenziare i Th1 ed i Th2. Linfociti CD4⁺ acquisiscono un fenotipo Th17 caratterizzato dall'espressione del fattore di trascrizione ROR- γ t, dopo attivazione del TCR in presenza di TGF- β e IL-6. L'espansione di questa sottopopolazione di linfociti è anche sostenuta dalla presenza di IL-1 β e TNF- α ; anche IL-23 ha la capacità di aumentare la produzione di IL-17 ed è richiesta per mantenere elevati i livelli di tale citochina.

[Digitare il testo]

IL-17 agisce su diversi tipi cellulari inducendo il rilascio di IL-6, IL-1 α , TNF- α , e varie chemochine che sostengono la reazione immunitaria caratterizzata dall'infiltrazione di neutrofili.

Quindi i Th17 sono implicati in processi patologici importanti, quali la difesa contro le infezioni, l'autoimmunità, le malattie infiammatorie croniche e allergiche; su queste cellule e su IL-17 sono stati condotti diversi studi volti ad evidenziarne il ruolo patogenetico.

4.1 Struttura e meccanismo d'azione

IL-17 è un polipeptide omodimerico glicosilato di 20-30 kDa appartenente ad una famiglia di citochine che comprende diversi membri, tra cui IL-17A e IL-17F; oltre che dai Th17 è secreta anche da altri tipi di cellule, come i linfociti T CD8+, CD4-/CD8-, i linfociti T- $\gamma\delta$, i neutrofili e le cellule natural killer (NK).

Per esercitare le sue funzioni, IL-17 si lega ad un recettore di tipo I, chiamato IL-17R, di cui sono presenti almeno tre varianti: IL-17RA, IL-17RB e IL-17RC.

Come le stesse citochine anche i rispettivi recettori presentano strutture diverse a seconda del tipo di interleuchina che andranno a legare.

Il recettore per IL-17A, IL-17R, è una proteina transmembrana tipo I e si trova in molti tipi di cellule umane e murine, come le cellule epiteliali, i fibroblasti, i linfociti B e T ed i neutrofili.

L'attivazione di questo recettore di solito rappresenta l'induzione di altre citochine proinfiammatorie.

4.2 Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione

IL-17 ha un effetto pleiotropico sulle cellule dei tessuti e su molte cellule immunitarie ed agisce come un potente mediatore infiammatorio favorendo il rilascio di citochine e la produzione di chemochine in vari tessuti per reclutare monociti e neutrofili nel sito d'infiammazione. Inoltre i Th17 sono responsabili anche della produzione di IL-21, una citochina in grado di stimolare la proliferazione dei linfociti stessi.

Nel corso degli studi è stata dimostrata la sua azione modulatoria.

È stato dimostrato un coinvolgimento di IL-17 nella produzione di immunoglobuline anti-dsDNA, che è una caratteristica clinica presente anche nei pazienti affetti da ALPS.

In conclusione, visti i molteplici ruoli di IL-17 nel sostegno della risposta immunitaria in molte malattie autoimmuni come la sclerosi multipla, il LES, la psoriasi e l'artrite reumatoide, molti lavori si sono rivolti allo studio degli effetti dati dalla neutralizzazione, mediante anticorpi monoclonali specifici, di tale citochina.

Il trattamento con un anti-IL-17A è risultato essere protettivo nel modello murino dell'allergia bronchiale. Anche nei topi *Collagen-Induced Arthritis* (CIA), la diffusa infiammazione a livello

[Digitare il testo]

delle sinovie, che solitamente sviluppano, è attenuata dal trattamento con un mAb anti-IL-17A o con il recettore solubile di IL-17 stessa fusa ad una immunoglobulina (Ig). Stessi risultati si osservano nel modello murino per il morbo di Chron. Inoltre anticorpi anti-IL-17A migliorano lo score clinico dell' *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), modello murino della SM, confermando i dati per cui il genotipo IL-17 -/- è protetto dallo sviluppo della malattia [27].

Quindi un trattamento con anticorpi neutralizzanti IL-17 potrebbe avere un ruolo terapeutico in molte malattie, anche di origine autoimmune.

5. Il Recettore del Plasminogeno Attivato di tipo Urochinasi (uPAR)

Un' altra molecola coinvolta in numerosi eventi fisiologici e patologici, tra cui angiogenesi, infiammazione, invasione, trombolisi e vascolarizzazione è il recettore del Plasminogeno Attivato di tipo Urochinasi (uPAR) [28]. Tutti questi eventi si basano sull'abilità delle cellule di migrare e invadere i tessuti che è strettamente legato alla riorganizzazione del citoscheletro, all'adesione a cellule vicine e alla degradazione della matrice extra cellulare circostante.

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

Esiste poi una forma solubile di tale recettore (suPAR) che amplia ulteriormente lo spettro di azione e le funzioni del sistema di attivazione del Plasminogeno di tipo Urochinasi [29].

5.1 Struttura e meccanismo d'azione

uPAR (CD87) è una Serin-proteasi altamente glicosilata di 50-65 kD, sintetizzata come una singola catena polipeptidica di 313 amminoacidi, il cui gene è situato a livello del cromosoma 19 [28;30;31]. In seguito ad una serie di modificazioni post-traduzionali, la proteina viene legata alla membrana plasmatica cellulare tramite un'ancora di Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI) [32] Il recettore è costituito da tre domini che, a partenza dall'N-terminale sono: D1,D2,D3 [28].

uPAR è stato inizialmente identificato come il recettore di uPA, con il ruolo di concentrare l'attivazione proteolitica del Plasminogeno a Plasmina sulla superficie di cellule in migrazione. La Plasmina infatti, degrada componenti della matrice extra cellulare sia direttamente che indirettamente, attraverso l'attivazione delle metalloproteasi (MMPs) [33]. uPAR può inoltre legare la Vitronectina, nota anche come proteina S (sierica o a livello della matrice extra cellulare), forme clivate del Chininogeno ad alto peso molecolare e diverse integrine [28].

[Digitare il testo]

La presenza di un adattatore trans-membrana è di fondamentale importanza per la trasduzione del segnale via uPAR [32]. L'interazione può avvenire con almeno due categorie di proteine trans-membrana: le integrine e la famiglia dei recettori associati a proteine G, in particolare il *Formyl Peptide Receptor* (FPRL1).

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

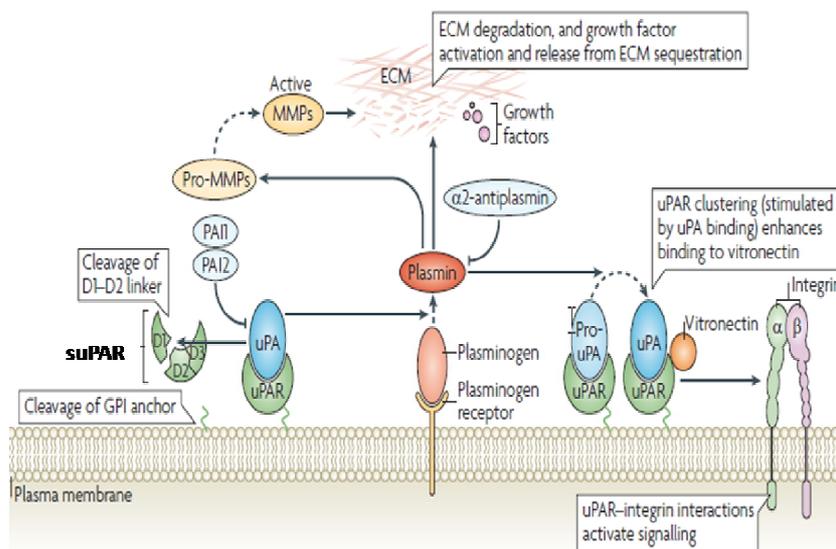


Figura 1. Funzione e regolazione del sistema uPA/uPAR

suPAR, è rilasciato dalla membrana plasmatica in seguito al clivaggio dell'ancora GPI. **Figura 2**. La rottura proteolitica del legame può avvenire ad opera di Tripsina, Chimotripsina, Elastasi, Catepsina G, metalloproteasi ma anche di Plasmina e uPA stesso.

Questa porzione libera del recettore non è solo prodotto di degradazione ma è dotata di funzioni indipendenti, in parte ancora da chiarire.

L'aumento della forma solubile del recettore è in parte legato ad una aumentata espressione del recettore stesso a livello della superficie cellulare, tuttavia, è anche possibile che sia regolato indipendentemente e legato ad un aumento delle cellule esprimenti uPAR come: monociti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cellule tumorali [34;35]. Questo rilascio indipendente dall'espressione superficiale del recettore determina probabilmente una conseguente regolazione dell'adesione e migrazione cellulare anche da parte di suPAR [28].

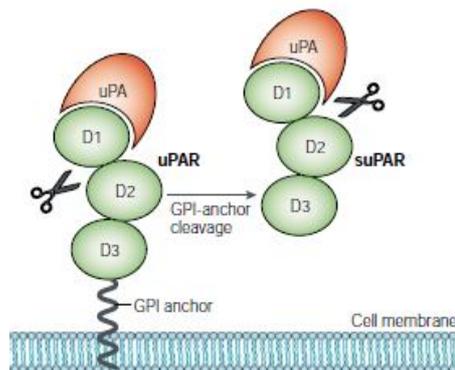


Figura 2. Siti di clivaggio proteolitico di uPAR. Il recettore è ancorato tramite il residuo GPI alla membrana plasmatica) e suPAR (forma solubile del recettore).

suPAR lega gli stessi ligandi di uPAR: uPA, forme clivate del Chininogeno ad alto peso molecolare e le Beta1 e Beta2 integrine, ma non il recettore FPRL1 (Formyl Peptide Receptor) [28;36]. suPAR può così competere con il recettore di membrana uPAR per il legame ai recettori extracellulari, riducendo quindi l'attività proteolitica di uPA a livello della superficie cellulare e l'adesione cellulare a Vitronectina; tuttavia, il recettore solubile può ancora attivare le integrine, inducendo quindi l'adesione cellulare all'endotelio [36].

5.2 Ruolo nel sistema immunitario e nell'infiammazione

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

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

suPAR, così come le forme clivate del recettore solubile sono potenti mediatori dell'adesione e migrazione monocitaria. Il sistema ha quindi un importante ruolo nella difesa dalle infezioni, un ruolo anti-infiammatorio (tramite l'azione fibrinolitica) ma anche pro-infiammatorio a causa del reclutamento delle cellule del sistema immunitario [37].

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

L'aumento dei livelli di suPAR è predittivo di mortalità in pazienti con HIV, batteriemia pneumococcica, meningite batterica, Tuberculosis, Malaria, febbre emorragica ma anche in pazienti senza una diagnosi nota di infezione [38;39].

I livelli di suPAR nell'HIV sono aumentati a livello del siero, dei tessuti e delle urine e hanno un importante valore prognostico e di severità di malattia paragonabile alla conta dei linfociti T CD4+

[Digitare il testo]

[40]. La valutazione dei livelli sierici di suPAR è stata proposta quale indicatore prognostico in pazienti con infezioni virali, batteriche, parassitarie, batteriemia e sepsi in numerosi studi [37;38;41;42]. I livelli di suPAR misurati durante la fase acuta di malattia erano indicativi della sopravvivenza sia a breve che a lungo termine [43].

suPAR potrebbe rappresentare anche un marker di infiammazione a basso grado ed essere predittivo dello sviluppo di Diabete Mellito di tipo 2, patologie cardiovascolari, neoplasie e mortalità generale a 10 anni [38]. suPAR è quindi un marcatore stabile di attivazione immunitaria e infiammazione cellulare dotato di particolare potere prognostico ma non diagnostico, a differenza di altri markers comunemente utilizzati oggi quali la PCR o la Pro-Calcitonina e con i quali dovrebbe essere valutato in modo complementare. Quest'ultimo aspetto è di particolare rilevanza nella diagnosi differenziale tra infiammazione ed infezione, soprattutto ai fini terapeutici nelle patologie autoimmuni ed infiammatorie [43].

MATERIALI e METODI

1. Trattamento di topi MRL/lpr mediante un anticorpo monoclonale neutralizzante IL-17

Topi MRL/lpr all'ottava settimana di vita, momento in cui sviluppano i primi sintomi della malattia, sono stati trattati con 100µg di un anticorpo anti-IL-17 commerciale (R&D MAB421) o 100µg del rispettivo controllo isotipico IgG_{2A}, anch'esso commerciale (R&D MAB006), risospesi in 100µl di PBS (*Phosphate buffered saline*). Un altro gruppo di animali è stato trattato con solo PBS. Ogni gruppo è composto da 8 animali in totale. Il trattamento viene somministrato mediante iniezioni intraperitoneali, una ogni tre giorni, per un totale di quattro volte. Gli animali vengono poi eliminati quindici giorni dopo l'ultima iniezione. Qui di seguito è riportata una rappresentazione grafica della tempistica utilizzata e delle principali caratteristiche sviluppate dagli animali nel corso della malattia. **Figura 3.**

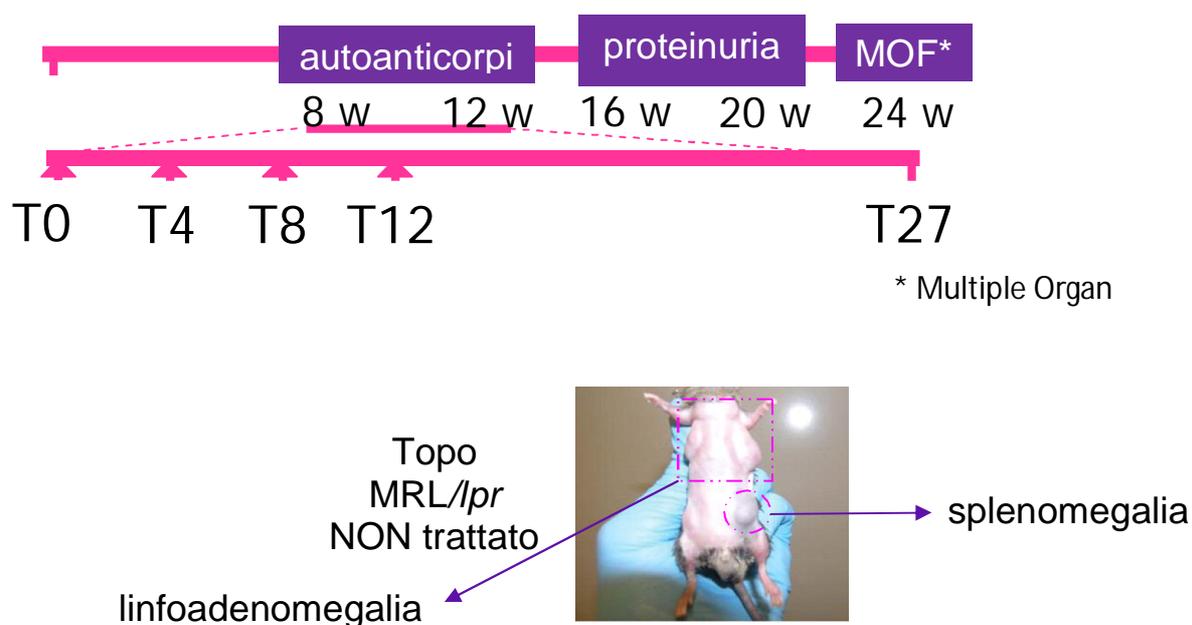


Figura 3. Rappresentazione schematica della tempistica utilizzata per il trattamento e principali sintomi sviluppati dai topi MRL/lpr

L'esperimento ha quindi termine al T27 dalla prima iniezione effettuata; è stato quindi prelevato tutto il sangue dell'animale, gli organi linfatici secondari, milza e linfonodi (precisamente sublinguali, ascellari, mesenterici ed inguinali), ed i reni.

[Digitare il testo]

2. Separazione cellulare su gradiente Ficoll

Lo scopo di questa metodica è di poter isolare, dagli organi esportati dai topi, i linfociti presenti nel tessuto. La milza ed i linfonodi sono stati ridotti in poltiglia meccanicamente. L'omogenato è stato fatto passare attraverso un filtro da 100 μ M che trattiene i residui tessutali fibrosi. La sospensione è stata stratificata su di una soluzione di Lympholyte. Per i linfonodi è stato saltato il passaggio di stratificazione su gradiente. Il pellet cellulare è stato analizzato mediante citofluorimetria, per determinare la percentuale di linfociti T DN presenti nell'organo. Le cellule rimanenti sono state congelate a -80°C.

3. Citofluorimetria per linfociti T DN

La percentuale di cellule T DN è stata valutata sia nel sangue, che nella milza e nei linfonodi. Sono stati utilizzati 3 diversi anticorpi monoclonali marcati: un mAb anti-CD8 coniugato in FITC, un mAb anti-CD4 APC ed un anti-TCR $\alpha\beta$ PE. Per la metodica da sangue intero è stato necessario incubare i campioni anche con una soluzione lisante (Lysis Buffer, Beckton Dickinson, GmbH, Mannheim, Germany). L'analisi è stata fatta mediante citofluorimetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, GmbH, Mannheim, Germany).

4. ELISA anti-dsDNA e anti-IL-17A mouse

La concentrazione di autoanticorpi anti-dsDNA è stata dosata nel siero degli animali prelevato al giorno T27, come da protocollo (R&D system, and eBioscience). La concentrazione di IL-17A murina è stata dosata nei surnatanti di coltura cellulare (R&D system, and eBioscience). L'assorbanza è stata letta con un lettore per micropiastre (Bio-Rad, Hercules, CA); la curva standard è stata calcolata utilizzando il programma I-smart.

5. Valutazione dei livelli intracellulari di IL-17A

Cellule T attivate dopo cinque giorni di coltura in presenza di un anticorpo anti-CD3 (10 μ g/mL) e un anticorpo anti-CD28 (1 μ g/mL), stimulate o meno con IL-23 ricombinante murina (50ng/mL), sono state ri-stimate per 5 ore con Forbolo 12-miristilato 13-acetato (PMA) (50 ng/ml; Sigma Saint Louis, MO) più Ionomicina (500 ng/ml; Sigma). Al termine le cellule sono state permeabilizzate e la percentuale di IL-17A intracellulare è stata valutata incubando con un anticorpo monoclonale anti-IL-17A coniugato con Alexa Fluo 647 (eBioscience, San Diego, CA,USA).

[Digitare il testo]

L'analisi è stata fatta mediante citofluorimetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, GmbH, Mannheim, Germany).

Anche il surnatante di coltura, dopo i 5 giorni di attivazione cellulare, è stato collezionato e testato in ELISA.

6. Pazienti

Lo studio è stato condotto su 21 pazienti (15 affetti da ALPS e 16 da DALD); tutti diagnosticati e reclutati dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino, in accordo ai criteri diagnostici indicati nella revisione del 2010 pubblicata su *Blood* [8]. Inoltre sono stati analizzati 94 controlli sani confrontabili con i pazienti per sesso ed età. Sia i pazienti sia i controlli hanno fornito il loro consenso informato come previsto dalla dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995) [44].

7. Dosaggio di uPAR solubile

La concentrazione di uPAR solubile è stata dosata nel siero dei pazienti e dei controlli, mediante ELISA, seguendo il protocollo fornito dal produttore (R&D system, and eBioscience). La concentrazione minima dosabile è risultata essere di 15.65 pg/ml. L'assorbanza è stata letta tramite lettore ottico Spectra Count con filtro a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA). Infine, è stato utilizzato il programma I-smart per l'analisi dei dati e la costruzione della curva di regressione.

8. Citofluorimetria per valutare l'espressione in membrana di uPAR

L'espressione in membrana del recettore è stata valutata nel sangue periferico prelevato sia dai pazienti che dai controlli sani. Le cellule sono state incubate con un mAb anti-CD14 e con un anti-uPAR coniugato in PE; successivamente i campioni sono stati lisati con un tampone specifico per 30 minuti. L'analisi è stata fatta mediante citofluorimetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, GmbH, Mannheim, Germany).

9. Analisi statistiche

Il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato usato per l'analisi dei dati ottenuti dalle colture linfocitarie. Il test non parametrico di *Mann-Whitney* è stato utilizzato per l'analisi dei dati ottenuti

[Digitare il testo]

dagli esperimenti in vivo. La significatività statistica è stata attribuita per valori di $p < 0.05$. È stato impiegato il seguente software statistico GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RISULTATI

IL-17 SVOLGE UN RUOLO IMPORTANTE NELLO SVILUPPO DELLA MALATTIA IN TOPI LPR

Nel nostro laboratorio è già stato dimostrato che pazienti ALPS hanno elevati livelli serici di IL-17 rispetto a controlli sani ($p < 0.05$). Inoltre la percentuale di cellule Th17 nel sangue periferico ed i livelli di IL-17 rilasciati nel surnatante di coltura di linfociti T, risultano più elevate nei pazienti ALPS rispetto ai controlli sani. Sugerendo che questa citochina svolga un ruolo importante nel difetto apoptotico tipico dei pazienti ALPS. Infatti l'aggiunta di IL-17 durante un test di morte Fas-mediato protegge i linfociti dall'apoptosi. Questo La nostra ipotesi di lavoro è che neutralizzando IL-17 si potrebbe migliorare lo stato di malattia aumentando la responsività a Fas. Per tale ragione è stato effettuato uno studio in vivo su topi MRL/lpr, modello animale dell'ALPS. Topi all'ottava settimana di vita, età in cui sviluppano i primi segni evidenti della malattia, sono stati trattati con 4 iniezioni intraperitoneali di anticorpo neutralizzante la citochina IL-17 ogni 4 giorni oppure con il rispettivo controllo isotipico IgG_{2A}, oppure con soluzione fisiologica (8 animali per gruppo). I topi trattati sono stati soppressi 15 giorni dopo l'ultima iniezione e dagli animali sono stati prelevati i linfonodi (sublinguali, cervicali, ascellari, inguinali e mesenterici) e la milza, al fine di pesarli e misurarli e valutare quindi l'effetto sulla linfoproliferazione. Da tali organi sono state poi prelevate le cellule per valutare l'effetto del trattamento sulle popolazioni linfocitarie (in particolare i linfociti T DN). Inoltre, mediante puntura cardiaca e previa anestesia, è stato prelevato il sangue al fine di valutare la % di linfociti T DN circolanti, e sul siero derivato, gli anti-dsDNA per poter valutare gli effetti sull'autoimmunità.

1. Il trattamento con un anticorpo monoclonale anti-IL-17A riduce il volume degli organi linfatici secondari

Qui di seguito viene riportata un'immagine rappresentativa della riduzione di volume della milza di un animale trattato con il mAb anti-IL-17 (sotto; 1,8 cm di lunghezza) rispetto a solo controllo isotipico (sopra; 2,3 cm). **Figura 4a.** Nel grafico sottostante viene quindi rappresentata la media in mg degli organi prelevati. Le milze ed i linfonodi dei topi trattati con l'anti-IL-17 sono di volume significativamente minore (milze: media peso 220mg; linfonodi: media peso 482mg) rispetto a quello dei topi trattati con solo PBS (milze 333mg; linfonodi 842mg) $p < 0,001$. Inoltre anche i topi trattati con il controllo isotipico IgG_{2A} gli organi ingrossati rispetto ai trattati con il mAb anti-IL-17 (milze: media peso 305mg; linfonodi 668mg). **Figura 4b.**

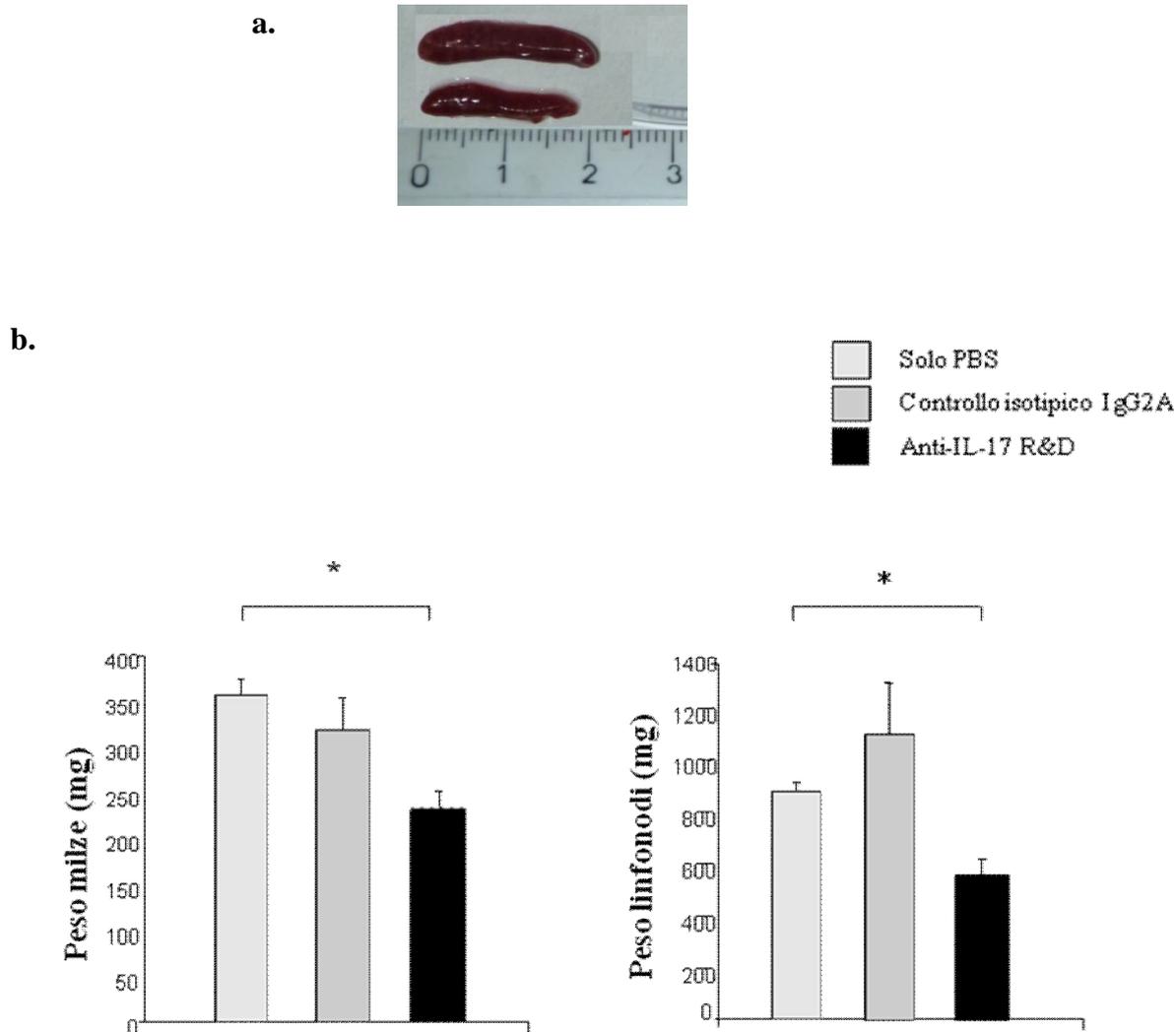


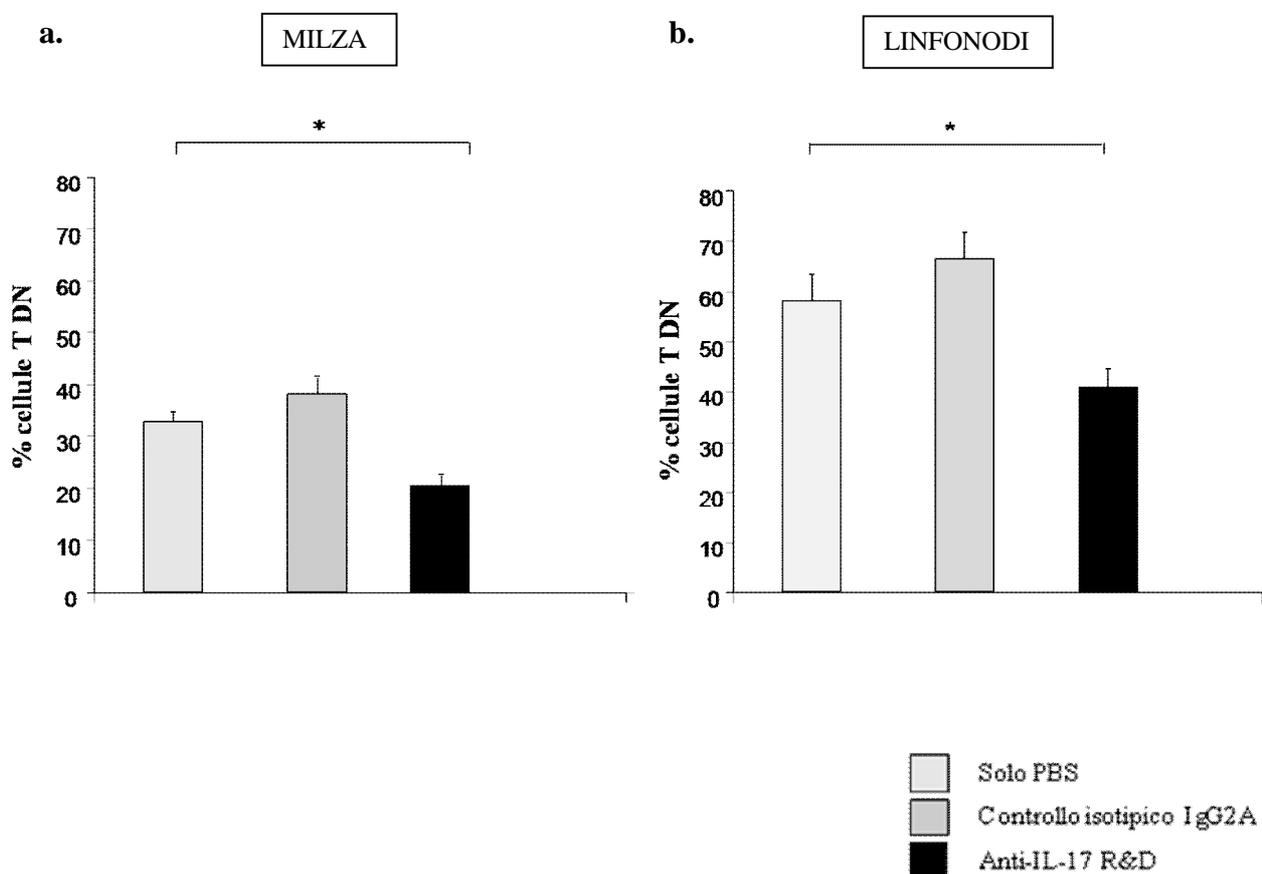
Figura 4. Il trattamento con anti-IL17 induce una riduzione del volume degli organi linfatici secondari in topi MRL/lpr. Sono stati trattati animali all'ottava settimana di vita con un mAb neutralizzante tramite 4 iniezioni intraperitoneali. 15 giorni dopo l'ultimo trattamento gli animali sono stati soppressi e gli organi linfatici secondari asportati. **4a.** Fotografia rappresentante la milza di un topo trattato con il controllo isotipico (sopra) e di un topo trattato con l'anti-IL-17 (sotto). **4b.** Grafico in cui sono state riportate le medie +/- errore standard (ES) del peso delle milze e dei linfonodi di topi lpr trattati con solo PBS (grigio 10%), animali a cui è stato somministrato il controllo isotipico IgG (grigio20%) e trattati con anti-IL-17 (nero). Test statistico di Mann-Whitney, esperimento su 8 animali * $p < 0,001$.

2. Il trattamento con anti-IL-17A riduce la percentuale dei linfociti T DN

Studi recenti mostrano che nei topi MRL/lpr, IL-17 è la maggiore citochina prodotta dalle cellule T DN infiltrate nei reni affetti da nefrite [16]. Si è così voluto indagare se l'effetto mostrato dall'Ab neutralizzante sul volume di milza e linfonodi, fosse in parte la conseguenza della riduzione dei DN presenti nei suddetti organi. Le cellule della milza e dei linfonodi sono state decorate con anticorpi diretti contro il TCR- $\alpha\beta$, per selezionare la popolazione T, anti-CD4 e anti-CD8 per individuare, per esclusione, la popolazione che non li esprime (doppia negativa) e successivamente analizzante mediante citofluorimetria a flusso. I risultati mostrano che negli organi considerati la percentuale del DN è minore nei topi trattati con anti-IL17, rispetto sia a quelli trattati con solo PBS o con IgG_{2A}. Milza: topi trattati con solo PBS media 33,28 % \pm 1,39 (errore standard E.S.); topi trattati con IgG_{2A} media 37,1 % \pm 4,72; topi trattati con mAb neutralizzante media 21,64 % \pm 1,2. Linfonodi: topi trattati con PBS media 58,2 % \pm 5,2; trattati con IgG_{2A} media 66,5 % \pm 5,1; trattati con mAb media 40,9 % \pm 3,8. **Figura 5a e 5b.**

Inoltre è stata anche valutata la presenza di DN circolanti nel sangue periferico. In questo caso l'effetto è ancora più evidente che negli organi: topi trattati con PBS media 41,06 % \pm 1,35 E.S.; trattati con IgG_{2A} media 47,9 % \pm 1,40; trattati con mAb neutralizzante media 28,55 % \pm 4,08.

Figura 5c.



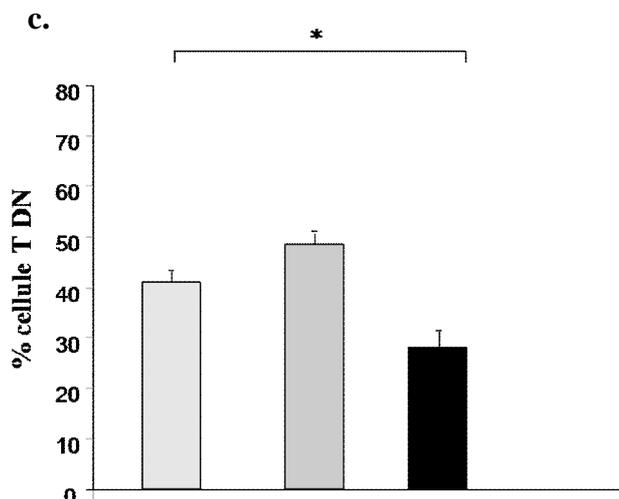


Figura 5. Il trattamento con anti-IL-17 induce una riduzione della percentuale di DN in topi *lpr*. La percentuale di doppi negativi viene valutata al citofluorimetro utilizzando 3 mAb specifici. Sono stati considerati topi trattati con solo PBS (grigio 10%) trattati con il controllo isotipico (grigio 20%) e trattati con anti-IL-17 (nero). **5a.** Grafico che mostra la percentuale di DN nella milza. **5b.** Percentuale di DN nei linfonodi. **5c.** Percentuale di DN nel sangue. Gli istogrammi rappresentano la media +/- ES. Test statistico di Mann-Whitney, esperimento su 8 animali * $p < 0,001$; linfonodi.

3. Il trattamento con anti-IL-17 diminuisce i livelli sierici di autoanticorpi anti-dsDNA

Nella seconda parte dello studio si è deciso di valutare se il trattamento con l'anti-IL-17 potesse anche migliorare lo stato di autoimmunità, sviluppata a partire dall'ottava settimana di vita degli animali stessi, mediante l'analisi dei livelli di auto-anticorpi anti-dsDNA presenti nel siero dei topi MRL/*lpr*. Tali anticorpi rappresentano i primi ad essere prodotti nel corso della malattia.

I sieri sono stati testati mediante saggio ELISA, la presenza di auto-anticorpi viene espressa in kU/ml. Come rappresentato nel grafico sottostante, i livelli sierici di anti-dsDNA sono significativamente inferiori nei topi trattati con anticorpo anti-IL-17 rispetto sia ai topi trattati con solo PBS che con il controllo isotipico (media topi solo PBS: 259,3 kU/ml; ctr IgG2A: 278,5 kU/ml; anti-IL-17: 123 kU/ml). **Figura 6.**

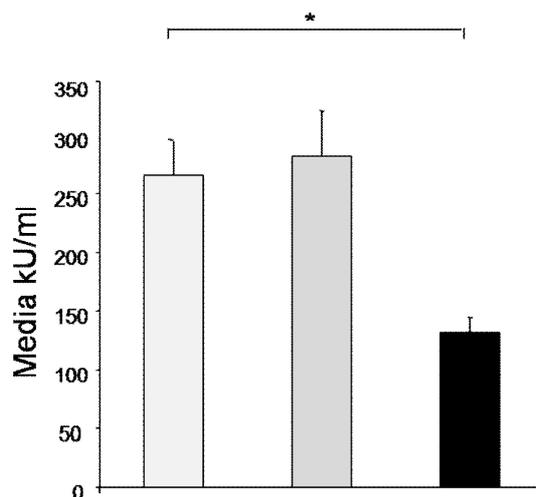


Figura 6. Il trattamento con anti-IL-17 riduce i livelli sierici di anti-dsDNA in topi lpr. La media \pm ES in kU/ml viene valutata mediante saggio ELISA. Sono stati considerati topi trattati con solo PBS (grigio 10%) trattati con il controllo isotipico (grigio 20%) e trattati con anti-IL-17 (nero). * $p < 0,05$ (test statistico: Mann-Whitney test).

suPAR IN PAZIENTI ALPS/DALD

Numerosi studi hanno già dimostrato il ruolo del sistema uP/uPAR/suPAR nel processo di risposta immunitaria, mediante la sua azione fibrinolitica e chemotattica sulle cellule immunitarie stesse.

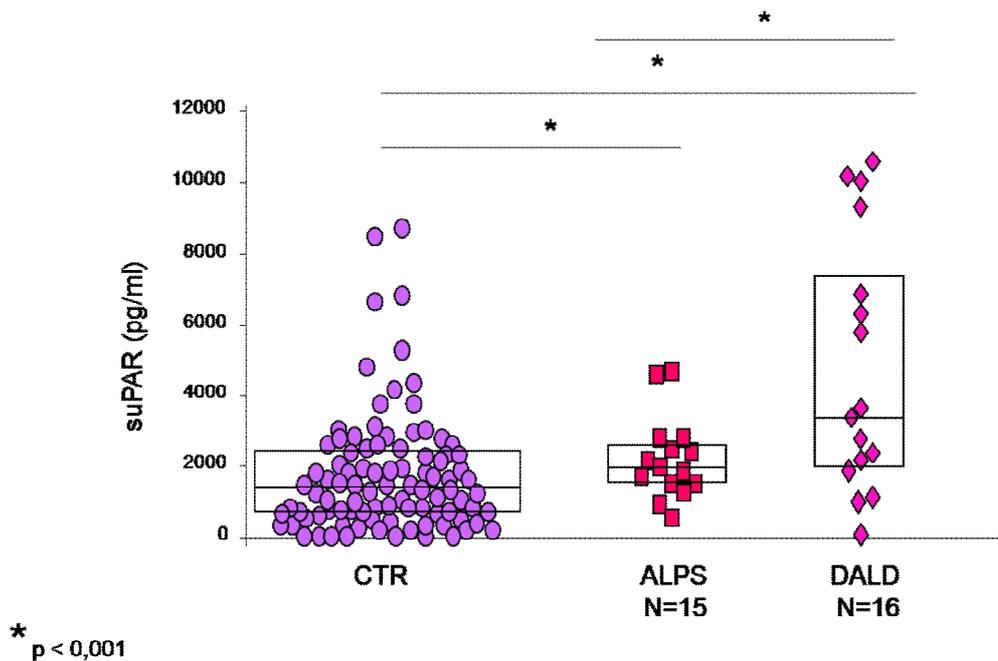
Il nostro laboratorio in collaborazione con il reparto di Rianimazione ed Anestesia dell'Ospedale Maggiore della Carità ha già dimostrato che pazienti in shock settico hanno elevati livelli della forma solubile del recettore uPAR nel siero. A sostegno di tali osservazioni sono stati pubblicati alcuni lavori in cui si mette in luce il valore prognostico negativo svolto da suPAR in pazienti settici. Si è quindi deciso di valutare i livelli sierici di suPAR e l'espressione in membrana del recettore in pazienti ALPS/DALD, caratterizzati essi stessi da elevati livelli di infiammazione sistemica, rispetto ad una popolazione di controlli sani. Sempre a supporto di tale ricerca vi sono ulteriori dati ottenuti dallo studio di pazienti con LES, in cui è stato dimostrato esserci un aumento anomalo dei livelli di suPAR.

8. I livelli sierici di suPAR sono aumentati nei pazienti con ALPS/DALD.

Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i livelli sierici della forma solubile del recettore di plasminogeno attivato sono elevati in pazienti con SIRS. Al fine di indagare il ruolo di questa molecola nell'infiammazione e nello sviluppo di autoimmunità/linfoproliferazione sono stati dosati i livelli sierici di suPAR in pazienti ALPS/DALD tramite saggio ELISA. Sono stati presi in

[Digitare il testo]

considerazione 31 pazienti affetti da ALPS e DALD, rispettivamente 15 e 16 soggetti, e 94 controlli sani. I pazienti hanno mostrato livelli sierici di suPAR significativamente più elevati (ALPS mediana 1985 pg/ml, DALD mediana 3427 pg/ml) rispetto ai controlli sani (mediana 1449 pg/ml; $p < 0,0001$). È interessante notare che i pazienti DALD livelli sierici significativamente maggiori anche rispetto agli ALPS. **Figura 8.**



*Figura 8. Livelli sierici di suPAR. Livelli sierici di uPAR solubile nei controlli sani (cerchi) e nei pazienti con ALPS (quadrati) o con DALD (rombi). Il box rappresenta la mediana e il 25° e il 75° percentile. * $p < 0,05$, Wilcoxon test.*

9. I livelli di espressione in membrana di uPAR decrescono nei pazienti con ALPS/DALD.

Ci siamo poi chiesti se l'incremento dei livelli di suPAR, osservato nel siero dei pazienti, fosse accompagnato parallelamente dalla diminuzione dei livelli di espressione in membrana di uPAR, come conseguenza del clivaggio, nei monociti presenti nel sangue periferico dei pazienti stessi.

Qui di seguito è riportato un dot-plot rappresentativo che mostra la popolazione di monociti presente nel sangue periferico. I livelli di espressione del recettore uPAR presenti sulla membrana di queste cellule sono rappresentati come un istogramma. Come è possibile osservare, pazienti ALPS presentano un decremento nei livelli di espressione di uPAR rispetto ai controlli sani, ma un aumento rispetto ai pazienti DALD. Sono stati rappresentati i valori di mediana, 75th percentile e 25th; precisamente si sono osservati i seguenti valori: controlli mediana 578% 25th 463,68- 75th 945,23; ALPS mediana 535,44% 25th 398,85- 75th 708,9; DALD mediana 337,28% 25th 185,52- 75th 529,74.

[Digitare il testo]

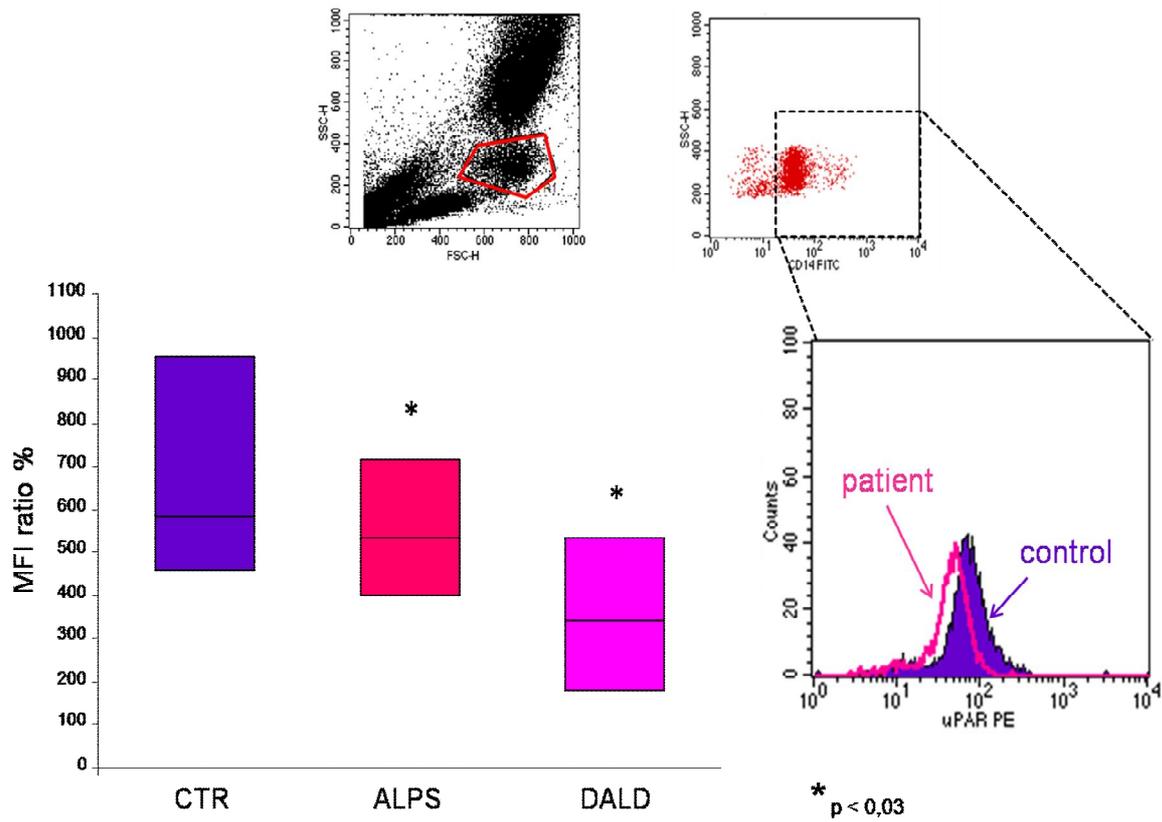


Figura 9. I livelli di espressione in membrana di uPAR diminuiscono in modo significativo nei pazienti ALPS/DALD. Nella parte superiore della figura è rappresentato un dot plot ottenuto mediante acquisizione al citofluorimetro di sangue intero. L'analisi è stata fatta sulla popolazione di PBMC CD14 positiva (monociti). Viene rappresentata la percentuale di MFI ratio di controlli sani (bluette) pazienti ALPS (fucsia) e DALD (rosa). Test statistico di Mann-Whitney. * $p < 0,03$. Il box rappresenta la mediana, il 25th e 75th percentile.

Sulla destra è riportato un istogramma rappresentativo di un controllo ed un paziente relativo all'intensità di fluorescenza.

DISCUSSIONE

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

Il nostro laboratorio ha così deciso di valutare se IL-17 fosse coinvolta nei meccanismi patogenetici dell'ALPS, studiandone il ruolo anti-apoptotico nello sviluppo della malattia.

L'ALPS infatti è una rara malattia autoimmune caratterizzata da un disordine dell'omeostasi dei linfociti causata da un difetto dell'apoptosi che porta ad un accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, e ad espansione di linfociti T doppi negativi DN, TCR $\alpha\beta$ positivi [5;7].

Segni clinici di questa malattia sono una marcata splenomegalia e linfadenomegalia nei pazienti affetti ed in alcuni casi epatomegalia. Sul versante autoimmunitario essi presentano citopenie ricorrenti a carico delle diverse linee ematopoietiche (anemia emolitica, neutropenia o trombocitopenia autoimmuni).

Il recettore Fas riveste un ruolo essenziale nell'eziopatogenesi dell'ALPS, infatti mutazioni nel suo gene sono responsabili del difetto apoptotico alla base della sindrome; altri geni coinvolti nella via del segnale dell'apoptosi di cui è stato dimostrato il ruolo eziopatogenetico nella diagnosi di questa malattia sono Fas-L o caspasi 10. L'ALPS, inoltre, presenta un quadro oligogenico e multifattoriale. Infatti, tra i pazienti esiste una grande variabilità clinica, non solo tra quelli con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione. Spesso la malattia è legata a mutazioni eterozigoti con dominanza incompleta e il genitore portatore della mutazione è in genere sano [23].

Il modello animale sperimentale dell'ALPS è rappresentato dai topi MRL/*lpr*, portatori di una mutazione *loss of function* nel gene Fas responsabile dello sviluppo di anomalie quali linfadenopatia, splenomegalia, produzione di autoanticorpi, artrite, glomerulonefrite ed espansione periferica di linfociti T DN.

Studi compiuti nel nostro laboratorio hanno evidenziato il coinvolgimento dei linfociti Th17, con l'aumento dei livelli di IL-17, in questa malattia; questa ipotesi trova conferma nel fatto che il topo MRL/*lpr* presenta elevati livelli di IL-17, prodotti in gran parte dai linfociti T DN presenti a livello dei linfonodi.

IL-17 è una citochina prodotta da diversi tipi cellulari, quali Th17, linfociti T CD47⁺CD8⁺, DN, linfociti T $\gamma\delta$, granulociti neutrofili e cellule natural killer; IL-17 ha una potente azione infiammatoria che favorisce il rilascio di citochine e chemochine responsabili del reclutamento di neutrofili e monociti nei siti d'infiammazione.

[Digitare il testo]

L'unico trattamento farmacologico per l'ALPS è la somministrazione di corticosteroidi o altri immunosoppressori anche se, a lungo termine, sono molteplici gli effetti collaterali.

Si è perciò alla ricerca di nuovi ed innovativi trattamenti farmacologici che possano migliorare lo stato di salute dei pazienti affetti, agendo in maniera più mirata.

Quindi grazie alle osservazioni sperimentali fatte nel nostro laboratorio, che dimostrano il coinvolgimento dell' IL-17 nella patogenesi dell' ALPS, si è ipotizzato che la neutralizzazione di tale citochina potesse migliorare lo stato di malattia limitando la linfoproliferazione Fas-mediata e riducendo i livelli di autoimmunità. Per questo è stato effettuato uno studio in vivo sui topi MRL/lpr per valutare gli effetti sistemici di tale trattamento.

Topi all'ottava settimana di vita, ovvero momento in cui sviluppano i primi segni della malattia, sono stati trattati con un anticorpo commerciale in grado di neutralizzare IL-17 o con il rispettivo controllo isotipico IgG_{2A} versus solo PBS (gli animali sono stati allevati nelle stesse condizioni nello stabulario dipartimentale).

Al termine delle analisi è stato possibile verificare che il trattamento con un anticorpo monoclonale neutralizzante IL-17 migliora lo stato di malattia dei topi MRL/lpr. Infatti, la percentuale di linfociti DN è significativamente diminuita così come il volume degli organi linfatici secondari. Nei topi in cui è stato somministrato il mAb neutralizzante la citochina sono meno evidenti la splenomegalia e la linfoadenopatia ed hanno perciò risposto, positivamente, al trattamento.

Sulla base dei risultati ottenuti si può quindi affermare che la neutralizzazione della citochina IL-17, potrebbe rappresentare la nuova frontiera terapeutica nel trattamento dell'ALPS.

Inoltre studi preclinici hanno già dimostrato che l'immunizzazione passiva con anti-IL-17 è terapeutica in vari modelli animali di malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e la SM [27].

Il secondo progetto si è rivolto sempre allo studio dei meccanismi patogenetici alla base dell'ALPS, ma in particolare alla ricerca di marcatori molecolari diagnostici e prognostici, dato che tale malattia presenta un quadro oligogenico e multifattoriale.

Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno permesso di identificare una molecola coinvolta nello sviluppo dell'ALPS, una proteina pro-infiammatoria: Osteopontina (OPN). Alti livelli di tale citochina sono associati con determinati polimorfismi nel gene stesso e rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo dell'autoimmunità/linfoproliferazione.

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

[Digitare il testo]

OPN attraverso l'interazione con il recettore CD44, induce la secrezione di uPA e l'attività di NFκB attivando le vie di signaling mediate da Fosfatidil-Inositolo (PI)3-Kinasi/Akt/IKK favorendo quindi la motilità e l'invasività delle cellule neoplastiche [45;46].

Inoltre l'intero sistema uPA/uPAR/suPAR risulta essere coinvolto nel processo di risposta immunitaria, svolgendo un ruolo importante nella difesa dalle infezioni, mediante l'azione fibrinolitica, ma nello stesso tempo anche pro-infiammatorio con il reclutamento di cellule immunitarie [37]. Le cellule esprimenti uPAR sono infatti principalmente monociti e macrofagi, ma anche cellule endoteliali, muscolari lisce e tumorali. Precisamente, uPAR (CD87) è una Serin-proteasi altamente glicosilata che, in seguito ad una serie di modificazioni post-traduzionali, viene legata alla membrana plasmatica cellulare tramite un'ancora di Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI) [32]. Vi può essere una rottura proteolitica del legame tra recettore e ancora GPI che può avvenire ad opera di Tripsina, Chimotripsina, Elastasi, Catepsina G, metalloproteasi ma anche di Plasmina e uPA stesso, con il rilascio della forma solubile chiamata suPAR.

Vista la possibilità di dosare suPAR nel siero, mediante ELISA, tale molecola può rappresentare un possibile marcatore stabile di attivazione immunitaria e di infiammazione.

Studi effettuati nel nostro laboratorio in collaborazione con il reparto di Rianimazione di Novara, hanno permesso di individuare che pazienti in shock settico presentano elevati livelli di suPAR e di OPN rispetto ai valori dosati al giorno del ricovero in reparto. Si è deciso di approfondire il meccanismo di regolazione che intercorre tra il sistema uPAR/suPAR e OPN. Tramite saggi in vitro è stata analizzata l'espressione in membrana e dell'RNA messaggero di uPAR in monociti stimolati o meno con OPN. In parallelo sono stati dosati i livelli della forma solubile del recettore nel surnatante di coltura delle stesse cellule. I risultati dimostrano che OPN è in grado di stimolare il rilascio di suPAR, agendo così sulla diminuzione dei livelli della forma di membrana, ma non sui livelli di mRNA trascritto. E' stato quindi dimostrato che elevati livelli di OPN incrementano il rilascio di suPAR mediante almeno 2 meccanismi: il primo tramite l'induzione del clivaggio dalla membrana del recettore ed il secondo inducendo la trascrizione del gene che incrementa i livelli di uPAR stesso generando un *loop* positivo.

Dato che il nostro laboratorio aveva già dimostrato nel 2004 che elevati livelli di OPN sono un fattore di rischio per lo sviluppo dell'ALPS, si è deciso di valutare anche i livelli di suPAR e l'espressione in membrana del recettore stesso, in pazienti ALPS/DALD, valutando poi in un secondo momento se i valori ottenuti correlano con quelli di OPN. I risultati fin qui ottenuti mostrano che pazienti ALPS hanno elevati livelli sierici di suPAR rispetto ad un gruppo di controlli sani; incremento ancora più significativo in pazienti DALD. Tali valori sono accompagnati parallelamente da una diminuzione dell'espressione in membrana del recettore. Sono infatti stati

[Digitare il testo]

dosati i livelli dell'espressione di uPAR in monociti presenti nel sangue periferico (come già riportato, la popolazione che esprime maggiori livelli del recettore).

Si è così confermato quanto osservato già negli esperimenti in vitro: l'aumento della forma solubile del recettore è accompagnata direttamente dal clivaggio, con conseguente diminuzione nell'espressione, della forma di membrana uPAR.

PROSPETTIVE FUTURE

Progetto IL-17.

Si vuole andare a valutare la % di interleuchina intracellulare ed i livelli nel surnatante di coltura di cellule della milza, attivate per 5 giorni e stimolate o meno con rIL-23Ms. L'idea di effettuare anche tale saggio deriva dal fatto che studi in vitro, effettuati nel nostro laboratorio, hanno permesso di evidenziare che cellule T, purificate dal sangue periferico dei pazienti ALPS/DALD messe in coltura per cinque giorni con stimoli attivatori, hanno elevati livelli di citochina sia intracitoplasmatica che nel surnatante di coltura rispetto a donatori sani. Si vuole perciò valutare se il trattamento con un mAB neutralizzante l'IL-17 potesse in qualche modo modulare il rilascio della citochina stessa.

Si potrà poi studiare anche gli effetti di vaccinazione attiva, sempre nel modello MRL/*lpr*, costituita dal complesso proteina IL-17 coniugata con Ovalbumina.

Se tutti questi studi porteranno ad un riscontro positivo, con il miglioramento dello stato di malattia, si potrà effettivamente pensare ad un'alternativa specifica nel trattamento dei pazienti ALPS/DALD (ora curati solamente con importanti quantità di corticosteroidi).

Progetto uPAR.

Si andranno ad identificare le variazioni nucleotidiche nel gene uPAR nei pazienti ALPS/DALD ed eventualmente determinare il loro ruolo nel sistema uPAR/suPAR. Infatti è già stato dimostrato che uno SNP localizzato nella regione del promotore del gene codificante per uPAR (CD87) è associato a complicazioni vascolari in pazienti con sclerosi sistemica.

Si cercherà di approfondire se i livelli delle molecole, forma ancorata in membrana e solubile, sono in grado di permettere la discriminazione tra pazienti ALPS e DALD, ad oggi solo differenziati dalla % di DN (pazienti ALPS hanno % di linfociti DN > 2%). E' stato infatti dimostrato che l'incremento di suPAR nel siero e la diminuzione in membrana di uPAR sono, rispettivamente, significativamente aumentate e ridotte nei pazienti DALD rispetto agli ALPS.

Essendo uPAR una molecola coinvolta nella patogenesi dell'ALPS/DALD, si potrà determinarne il ruolo anche nel modello murino, topi MRL/*lpr*.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. Canale V.C., Smith C.H. (1967) *Journal of Pediatrics* 70, 891-99
3. Fischer G.H., Rosenberg F.J., Straus S.E., Dale J.K., Middleton L.A., Lin A.Y., Strober W., Lenardo M.J., Puck J.M. (1995) *Cell* 81, 935-46
4. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C., Roberts I.A., Debatin K.M., Fischer A., De Villartay J.P. (1995) *Science* 268, 1347-9
5. Straus S.E., Sneller M., Lenardo M.J., Puck J.M., Strober W. (1999) *Annals of Internal Medicine* 130, 561-601
6. Lopatin U., Williams R.K., Bleesing J.H., Dale J.K., Wong D., Feldstein J.T., Fritz S., Morrow M.R., Fuss I., Sneller M.C., Raffeld M., Fleisher T.A., Puck J.M., Strober W., Jaffe E.S., Straus S.E. (2001) *Blood* 97, 3161-70
7. Bleesing J.H., Brown M.R., Straus S.E., Dale J.K., Siegel R.M., Jonhson M., Lenardo M.J., Puck J.M., Fleisher T.A. (2001) *Blood* 98, 2466-73
8. Oliveira J.B., Bleesing J.J., Dianzani U., Fleisher T.A., Jaffe E.S., Lenardo M.J., Rieux-Laucat F., Siegel R.M., Su H.C., Teachey D.T., Rao V.K. (2010) *Blood* [Epub ahead of print]
9. Lev A., Simon A.J., Amariglio N., Rechavi G., Somech R. (2012) *Autoimmunity Reviews* 11:723-30.
10. Campagnoli M.F., Garbarini L., Quarello P., Garelli E., Carando A., Baravalle V., Doria A., Biava A., Chiocchetti A., Rosolen A., Dufur C., Dianzani U., Ramenghi U. (2006) *Haematologica* 91, 538-41
11. Martin D.A., Zheng L., Siegel R.M., Huang B., Fisher G.H., Wang J., Jackson C.E., Puck J.M., Dale J., Straus S.E., Peter M.E., Krammer P.H., Fesik S., Lenardo M.J. (1999) *PNAS* 96, 4552-7
12. Rennò T., Hahne M., MacDonald H. (1995) *The Journal of Experimental Medicine* 181, 2283-7
13. Lee K.H., Feig C., Tchikov V., Schickel R., Hallas C., Schütze S., Peter M.E., Chan A.C. (2006) *The EMBO Journal* 25, 1009-23
14. Peter M.E., Krammer W. (2003) *Cell Death and Differentiation* 10, 26-35
15. Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995) *Cell* 81, 505-12
16. Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wan L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7464-9

17. Nagata S. (1997) *Cell* **88**, 355-65
18. Los M.C., Stroh C., Jäniche R.U., Engels I.H., Schulze-Osthoff K. (2001) *Trends of Immunology* **22**, 31-4
19. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 20633-40
20. Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H., Peter M.E. (1999) *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 1541-8
21. Benihound K., Bonardelle D., Bobe P. and Kiger N. (1977) *European Journal of Immunology* **27**, 415-20
22. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C., Copeland N., Jenkins N., Nagata S. (1992) *Nature* **356**, 314-7
23. Jackson C.E., Fischer R.E., Hsu A.P., Anderson S.M., Choi Y., Wang J., Dale J.K., Fleisher T.A., Middleton L.A., Sneller M.C., Lenardo M.J., Straus S.E., Puck J.M. (1999) *The American Journal of Human Genetics* **64**, 1002-14
24. Ramenghi U., Bonisconi S., Migliaretti G., DeFranco S., Bottarel F., Gambaruto C., Di Franco D., Priori R., Conti F., Dianzani I., Valesini G., Merletti F. and Dianzani U. (2000) *Blood* **95**, 13176-82
25. Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Mesturini R., Giordano M., Sametti S., Castelli L., Bottarel F., Mazzarino M.C., Garbarini L., Giacomelli F., Valesini G., Santoro C., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (2004) *Blood* **103**, 1376-82
26. Clementi R., Chiocchetti A., Cappellano G., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C., Bozzi V., Putti M.C., Cerutti F., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (2006) *Blood* **108**, 3079-84
27. Uyttenhove C., Sommereyns C., Th'Eate I., Michels T., and Snick J.V. (2007) Anti-IL-17A Autovaccination Prevents Clinical and Histological Manifestations of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1110: 330-336
28. Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. (2005) *Thromb Haemost* 93:192-8
29. Slot O, Brünner N, Loch H, Oxholm P, Stephens RW. (1999) *Ann Rheum Dis* ;58:488-9
30. Møller LB, Ploug M, Blasi F. (1992) *Eur J Biochem*;208:493-500
31. Casey JR, Petranka JG, Kottra J, et al. (1994) *Blood*; 84:1151-56
32. Plesner T, Behrendt N, Ploug M. (1997) *Stem Cells*;15:398-408
33. Blasi F, Carmeliet P. (2002) *Nature Rev*;3:932-43
34. Børre F, Eugen-Olsen J, Yndestad a, Brosstad F, Beiske K, et al. (2009) *J Clin Immunol*;131:438-46

35. Chavakis T, Willuweit AK, Lupu F, Preissner KT, Kanse SM. (2001) *Thromb Haemost*;86:686-93
36. Muntuori N, Carriero MV, Salzano S, et al. (2002) *J Biol Chem*;277:46932-9
37. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Sanson E, Duckers H, Andreas H, et al. (2011) *Crit Care Feb*;16;15(1):R63
38. Eugen-Olsen J. (2011) *J Intern Med Jul*;270(1):29-31
39. Rabna P, Andersen A, Wejse C, Oliveira I, Gomes VF, Haaland MB et al. (2009) *Trop Med Int Health*;14(9):986-94
40. Mondino A, Blasi F. (2004) *TRENDS in Immunol*;25(8):450-5
41. Wittenhagen P, Kronborg G, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, Olsen Eugen J. (2004) *Clin Microbiol Infect*;10(5):409-15
42. Huttunen R, Surjänen J, Vuento R, et al. (2011) *J Intern Med Jul*;270(1):32-40
43. Kofoed K, Andersen O, Kronborg g, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, Larsen K. (2007) *Critical Care*;11(2):R38
44. International Committee of Medical Journal Editors (1995) *British Medical Journal* **311**, 1272
45. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Ye SL. (2010) *Mol Biol Rep Aug*;38(6):3671-7.
46. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. (2005) *IUBMB Life*;57(6):441-447.

ELENCO DEI SEMINARI FREQUENTATI AA 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 Philipssen, (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. “*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
8. “*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
9. “*Convivere con la Leucemia Mieloide Cronica*”; tenuto dal Prof. Gianluca Gaidano, (Università del Piemonte Orientale); Dipartimento di Scienze Mediche, 29 Maggio 2012
10. “*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

11. “*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
12. “*Implicazioni mediche delle patologie odontostomatologiche di carattere infettivo-infiammatorio*”; tenuto dal tenuto dal Dr. Roberto Abundo; Dipartimento di Scienze Mediche, 17 Aprile 2012
13. “*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
14. “*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
15. “*Molecular classification of multiple myeloma*”, tenuto dal Prof. Antonino Neri, (Università degli Studi di Milano); Dipartimento di Scienze Mediche, 22 Marzo 2012
16. “*Giornata delle biotecnologie mediche*”, tenuto da:
Dott. Antonio Boniolo – Vice Presidente Diasorin S.p.A.
Dott.ssa Francesca Gilli - Presidente ANBI Piemonte
Prof. Cesare Emanuel - Presidente di Enne3 l’Incubatore di impresa di Novara
Dott.ssa Elena Rainero, (Beatson Cancer Insitute, Glasgow, UK)
Dott.ssa Deborah Locarno - Diasorin Research Center – Antibody Development Unit
Dott.ssa Silvia Rasi - Assegnista di ricerca - Laboratorio di Ematologia – Dipartimento di Medicina Traslazionale – Università del Piemonte Orientale;
Dipartimento di Scienze Mediche, 09 Marzo 2012
17. “*Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion*”, tenuto dalla Dott.ssa Elena Rainero, (Beatson Cancer Insitute, Glasgow, UK); Dipartimento di Scienze Mediche, 08 Marzo 2012
18. “*Exosomes Shuttle RNA*”, tenuto dal Prof. Lötval J., (Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg); Dipartimento di Scienze Mediche, 24 febbraio 2012
19. “*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
20. “*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
21. “*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

22. “*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
23. “*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
24. “*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
25. “*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
26. “*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

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA

Corso di tre giornate sul citofluorimetrio a flusso presso la sede della BD, con rilascio dell'attestato di partecipazione.

Corso d'inglese organizzato dalle ABES School, con rilascio dell' attestato di partecipazione.

CONGRESSI FREQUENTATI

8th International Congress on Autoimmunity; Granada, Spain 9-13 Maggio 2012

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

PUBBLICAZIONI

The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function.

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.

Hum Immunol. 2012 May;73(5):585-92. Epub 2012 Mar 7.