

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



**Epidemiologia Molecolare
della Sclerosi Multipla:
ruolo di OPN e ICOS come
potenziali marcatori di patogenesi**

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

**Tesi di Dottorato di Ricerca
Candidato: Castelli Luca
Relatore: Prof. Dianzani Umberto**

INDICE

Premessa.....	pag.3
Riassunto.....	pag.4
Introduzione	
Sclerosi Multipla	
a. Epidemiologia.....	pag.6
b. Eziologia.....	pag.10
c. Patogenesi.....	pag.15
d. Citochine e chemochine.....	pag.20
e. Modelli sperimentali.....	pag.23
Osteopontina	
a. Il gene e la molecola.....	pag.25
b. OPN e risposta immunitaria.....	pag.26
c. OPN e malattie autoimmuni.....	pag.29
ICOS	
a. Il gene e la molecola.....	pag.32
b. OPN e risposta immunitaria.....	pag.33
c. OPN e malattie autoimmuni.....	pag.38
Scopo del lavoro.....	pag.43
Materiali e Metodi	
A. Materiali e Metodi.....	pag.44
B. Materiali e Metodi.....	pag.48
Risultati A	
A1. I polimorfismi del gene OPN/ETA-1 sono associati con la suscettibilita' alla SM.....	pag.50
A2. I polimorfismi di OPN si associano al decorso clinico della SM.....	pag.53
A3. I pazienti SM mostrano livelli sierici di OPN maggiori dei controlli.....	pag.55
A4. Gli aplotipi al 3'UTR influenzano la stabilita' del mRNA di OPN.....	pag.57
Risultati B	
B1. Analisi della regione 3'UTR del gene ICOS.....	pag.59
B2. Il genotipo AA correla con il livelli di espressione di ICOS e IL10.....	pag.62
B3. L'omozigosi per l'aplotipo A correla con la suscettibilita' alla SM e con la gravita' della malattia.....	pag.64
Discussione A.....	pag.67
Discussione B.....	pag.71
Bibliografia.....	pag.73
Pubblicazioni.....	pag.93

PREMESSA

Il sistema immunitario protegge l'organismo da infezioni microbiche e dai tumori grazie a un enorme repertorio di recettori e anticopi che riconoscono virtualmente ogni tipo di antigene estraneo. La generazione di questa vasta diversità recettoriale/anticorpale, ha però come conseguenza il possibile sviluppo d'autoimmunità, cioè il riconoscimento di un antigene self come non-self e di indurre contro di esso una risposta immunitaria, di qui il termine autoimmune. Il rischio che questo avvenga è tuttavia limitato da una serie di processi che avvengono sia negli organi linfatici primari sia in periferia e che portano il sistema immunitario a essere tollerante al self. In alcuni casi tuttavia questi sistemi di controllo falliscono e si sviluppa la malattia autoimmune.

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune demielinizzante del SNC, a decorso cronico e progressivamente invalidante. È una patologia multifattoriale, che coinvolge sia fattori ambientali sia fattori genetici. La storia naturale di questa malattia è estremamente eterogenea, potendo contemplare al suo interno evoluzioni indolenti o al contrario aggressive e molto invalidanti. Età e sintomi d'esordio, sesso e deficit neurologici residui dopo la prima ricorrenza di malattia sono importanti fattori prognostici clinici e demografici, mentre ancora pochi e spesso discussi sono i markers genetici correlabili alla malattia e al suo decorso clinico.

Durante il corso di dottorato mi sono occupato di individuare marker genetici di suscettibilità e prognosi per la SM, indagando in particolare il ruolo del gene di osteopontina (OPN) e ICOS, due proteine coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria specifica.

RIASSUNTO

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da placche di demielinizzazione che portano ad una progressiva ed inesorabile distruzione della guaina mielinica. Il danno che ne deriva dipende dall'entità e dalla localizzazione delle lesioni. L'eziologia della patologia è tuttora ignota, ma è di probabile origine autoimmune ed è apparentemente mediata da un'eccessiva risposta proinfiammatoria di tipo Th1. Come nella maggior parte delle malattie autoimmuni, anche nella SM c'è una concomitanza di fattori ambientali che, in soggetti geneticamente predisposti, possono portare all'insorgenza della patologia. Questo lavoro prende in considerazione la variabile genetica della patologia, studiando l'effetto del gene di osteopontina (OPN) e di ICOS, due proteine coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria e della differenziazione dei linfociti T helper (Th). OPN è una citochina proinfiammatoria che favorisce la produzione di citochine di tipo Th1, quali IFN- γ e IL12, entrambe coinvolte nell'induzione e nel mantenimento della SM. OPN è stata dimostrata essere importante nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni. Il nostro laboratorio ha precedentemente dimostrato che i livelli sierici di OPN correlano con alcuni polimorfismi del gene e che alti livelli sierici di OPN sono correlati all'insorgenza della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), una rara malattia autoimmune ereditaria causata da un difetto del sistema Fas/FasL che è coinvolto nel processo di spegnimento della risposta immunitaria. Questo lavoro analizza il ruolo di OPN nella patogenesi della SM e dimostra che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del gene di OPN correlano non solo con la suscettibilità alla SM, ma anche con il suo decorso clinico, probabilmente in conseguenza di un effetto sulla produzione di OPN.

ICOS è una molecola costimolatoria espressa in membrana dai linfociti T in seguito all'attivazione, la cui funzione è probabilmente quella di favorire un'ulteriore attivazione dei linfociti T e/o indurre la sintesi di particolari citochine. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che ICOS possa essere coinvolto nella patogenesi della SM. Studi condotti sul topo indicano che ICOS stimola una prevalente produzione di citochine di tipo Th2, mentre nell'uomo sembra prevalere un effetto favorente sulla produzione di citochine di tipo Th1. In entrambe le specie tuttavia vari lavori indicano che ICOS in determinate circostanze può anche favorire una prevalente produzione della citochina antinfiammatoria IL10, che sembra avere un ruolo protettivo nei confronti di varie malattie autoimmuni compresa la SM. Pertanto ICOS potrebbe avere un duplice ruolo nella SM potendo favorire risposte immunitarie sia pro- sia anti-infiammatorie. Risultati ottenuti sulla encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), un modello murino della SM, dimostrano che il costimolo mediato da ICOS influenza in modo eterogeneo lo sviluppo della EAE e che il topo knockout (KO) per ICOS ha una aumentata suscettibilità all'induzione della EAE. Questo lavoro valuta il ruolo che polimorfismi nella regione 3'UTR del gene di ICOS hanno sulla suscettibilità genetica e sul decorso clinico della SM. I dati ottenuti indicano che alcuni di questi polimorfismi formano aplotipi che sono associati ad una maggiore suscettibilità alla malattia e che sembrano anche influenzare i livelli di espressione di ICOS in membrana e i livelli di IL10 prodotti dai linfociti T. In particolare gli aplotipi associati alla malattia sembrano favorire una maggiore espressione di ICOS e una minore produzione di IL10. Inoltre questi aplotipi correlano, nei pazienti, con un decorso clinico più sfavorevole.

INTRODUZIONE

SCLEROSI MULTIPLA

A. LA MALATTIA

La sclerosi multipla (SM) è la malattia demielinizzante a decorso cronico del Sistema Nervoso Centrale (SNC) di più frequente riscontro e dalla eziologia sostanzialmente ignota.

[1]

Fatta eccezione per i traumi del SNC, è la più frequente causa di disabilità neurologica in età giovanile e adulta. La sua frequenza è maggiore nel sesso femminile (rapporto M : F di 1,9 : 3,1), e il suo esordio si ha in genere tra i 20 e i 45 anni, raramente prima della pubertà.

Sono descritti casi di SM in tutto il mondo, ma si possono riconoscere aree geografiche ben definite per la differente incidenza della patologia.

Si riconosce una prevalenza della malattia decrescente da Nord a Sud, con picchi di 30 o più casi/100.000 nel Canada Meridionale, nella parte settentrionale degli USA, nell'Europa Centro-Settentrionale, nell'Australia Sud Orientale e nella Nuova Zelanda. Oggi si ritiene che la reale prevalenza di tale malattia in queste aree sia sensibilmente maggiore (circa 100 casi/100.000 abitanti). Zone a prevalenza intermedia sono costituite da USA Meridionale, area mediterranea, nel resto dell'Australia e nel Sud-Africa, dove il numero di casi è di 5-25 casi/100.000. Asia, Africa e Caraibi mostrano il minor numero di casi (5/100.000). La prevalenza più elevata in assoluto si registra nelle isole Orcadi (300/100.000). [2, 3]

L'Italia mostra una prevalenza di 30-70 casi/100.000 abitanti, con un numero totale di pazienti stimato in circa 50.000, mancato decremento nel passaggio da Nord a Sud ed anzi una prevalenza massima in Sicilia e Sardegna. [4]

Le differenze osservate nella distribuzione geografica sono in parte dovute a caratteristiche genetiche della popolazione, essendo la malattia più frequente nella popolazione caucasica e più rara in altri gruppi etnici. Tuttavia il ruolo di fattori ambientali importanti nella eziologia della malattia è reso evidente dalla descrizione di epidemie di SM.

Studi epidemiologici dimostrano che le popolazioni migranti tendono a mantenere il loro rischio di malattia inalterato rispetto all'area di origine, se la migrazione è avvenuta dopo il quindicesimo anno di età, a confermare la possibile azione di fattori ambientali in epoca infantile e/o nella prima adolescenza. [5, 6, 7]

I sintomi iniziali sono variabili, a seconda della sede lesionale, ma alcuni ricorrono più frequentemente, poiché le aree di demielinizzazione si distribuiscono in sedi preferenziali.

L'esordio non è in genere preceduto da alcun prodromo significativo e solo molto raramente segue una malattia infettiva o una sintomatologia astenica simil-influenzale. I disturbi si manifestano e raggiungono l'apice in poche ore o in alcuni giorni.

Nella maggior parte dei casi il sintomo iniziale è ipostenia ad uno o più arti (40% dei casi), neurite ottica (22%), turbe della sensibilità a tipo parestesie e disestesie (21%), diplopia, vertigini o disturbi della minzione. Tali sintomi possono comparire isolatamente o in associazione [8].

I disturbi iniziali tendono nella maggior parte dei casi a regredire dopo un variabile periodo di tempo ed in seguito possono ripresentarsi o possono comparire altri sintomi e segni di sofferenza focale del SNC.

Poche malattie sono così variabili ed imprevedibili come la SM, e diversa per ogni singolo caso sono l'età di esordio, il sintomo iniziale, la frequenza delle ricadute, il decorso della malattia, la disabilità e la sua progressione. Nei casi avanzati, tuttavia, i disturbi motori, la spasticità, i deficit visivi e turbe sfinteriche sono pressoché costantemente presenti. Anche

se ogni paziente presenta una diversa combinazione di sintomi, vi è un numero di pattern distinti che sono in relazione al decorso della malattia.

Nell' 70% dei casi la malattia si presenta e procede per ricadute. In questa forma definita a "ricadute e remissioni" (relapsing/remitting, RR) vi sono recidive imprevedibili durante le quali appaiono nuovi sintomi oppure i sintomi già presenti diventano più severi. Questa fase può avere una durata variabile (giorni o mesi) e vi è una remissione parziale o totale in circa uno o due mesi. La minima durata di una ricaduta è convenzionalmente stabilita in 24 ore. La malattia può rimanere inattiva per mesi, oppure per anni, anche se la frequenza delle esacerbazioni può essere stimata di circa 0,4-0,6 per anno ed in genere tende ad essere più frequente nei primi anni della malattia per poi diminuire.

Dopo un periodo variabile dall'esordio, in genere 5-20 anni, nella maggior parte dei casi il decorso diventa progressivo, con o senza ricadute sovrapposte, configurando la forma "progressiva secondaria" (SP).

Nel circa 10% dei casi, la malattia è progressiva fin dall'inizio senza attacchi distinti ma con un esordio lento ed un costante peggioramento dei sintomi definendo la forma "progressiva primaria" (PP).

Circa il 20% dei casi, la malattia ha un decorso particolarmente benigno, con una disabilità residua compatibile con un'autonomia completa, seppure con certe limitazioni.

Alcuni fattori sembrano in grado di influenzare l'evoluzione: le infezioni virali intercorrenti svolgono verosimilmente un ruolo scatenante per le ricadute; la gravidanza sembra aver un ruolo protettivo, ma più frequenti sono le ricadute nel puerperio; le fatiche fisiche o eventi psicologici possono precedere un aggravamento della malattia, ma il loro ruolo preciso e la loro reale importanza rimangono oscuri.

La SM presenta un decorso clinico estremamente variabile e ciò rende molto difficile la previsione di una progressione futura per ogni singolo caso, soprattutto all'esordio della

malattia. D'altra parte l'individuazione di marcatori prognostici permette di selezionare i pazienti a maggior rischio di disabilità, che necessitano maggiormente di un trattamento in fase precoce.

Vari studi hanno tentato di determinare i fattori più predittivi di un andamento positivo o negativo a lungo termine. Vi è una notevole concordanza di vedute nel considerare una indicazione di prognosi peggiore l'età d'insorgenza della SM. Si può arbitrariamente fissare 35 anni l'età al di sopra della quale l'esordio della malattia costituisce un elemento prognostico sfavorevole. Tra i fattori demografici analizzati, il sesso maschile soprattutto se associato alla forma progressiva di malattia, sembra predittivo di una prognosi sfavorevole.

Importante è anche il tipo di sistema funzionale coinvolto all'esordio. E' stato infatti dimostrato che la presenza di segni cerebellari, piramidali, troncali, e di sintomi psichiatrici o urinari, costituisce un indicatore prognostico sfavorevole. Viceversa l'interessamento iniziale del sistema visivo (neurite ottica retrobulbare) oppure di quello sensitivo sembra essere associato ad una prognosi migliore.

Le forme progressive di malattia (PP e SP) presentano un decorso più sfavorevole rispetto alla forma recidivante-remittente (RR).

B. EZIOLOGIA

FATTORI GENETICI

La possibilità che fattori genetici condizionino la suscettibilità individuale a contrarre la malattia è comprovata dalla significativa differenza di incidenza della SM in gruppi etnici differenti [9, 10]: in particolare la razza caucasica è quella più interessata e, a rafforzare l'ipotesi di un ruolo genetico, il 15% dei pazienti ha un parente affetto dalla medesima malattia. [11] Se i parenti di primo grado hanno un rischio di malattia stimato dell' 1-3% (a dispetto di 0.5-1 ‰ della popolazione), gli studi sui gemelli hanno dimostrato una concordanza del 28% per i monozigoti e del 5-7% per gli eterozigoti. [12] È stata descritta una associazione tra aplotipi HLA e rischio di malattia, anche se questi variano al variare della popolazione presa in considerazione: ad es. in Sardegna si riconosce una associazione tra malattia e HLA-DR4 e DQW3.

FATTORI INFETTIVI

Nonostante non si sia mai isolato un patogeno correlabile chiaramente all'insorgenza di SM secondo i postulati di Koch, [13] fin dalle prime descrizioni cliniche ad opera di Charcot, si è ipotizzato una possibile causa infettiva di tipo batterico, virale, da spirochete ecc. A favore di questa ipotesi si hanno almeno tre tipi di evidenze:

- è noto il potere demielinizzante di alcuni virus in sistemi sperimentali animali;
- sono noti patogeni umani possibili cause di demielinizzazione a carico di SNC e SNP;
- studi epidemiologici dimostrano vere e proprie epidemie di SM in tempi e luoghi ben definiti. Due sono i casi più noti segnalati: nelle isole Faroe [14], prima della II Guerra Mondiale, non erano mai stati segnalati casi di SM. Dopo il 1943 ci fu un aumento progressivo di casi fino al 1949, poi ridotti fino a scomparire dopo il 1977. Analogamente, in

Islanda si è registrato un aumento di casi di SM tra il 1922 e il 1945, in concomitanza con l'occupazione delle truppe inglesi e americane dell'isola.

I meccanismi ipotizzabili nella induzione di demielinizzazione sono almeno tre. È possibile *l'infezione diretta degli oligodendrociti*, che comporta la loro distruzione: tipico esempio è la leucoencefalite multifocale progressiva HIV-correlata, che colpisce il 4% dei pazienti, per azione oligodendrocitolitica mediata da JCV (un tipo di poliomavirus). Altro esempio è la panencefalite subacuta sclerosante, rara complicanza del morbillo che porta a distruzione, oltre che gli oligodendrociti, anche astrociti e neuroni. Una seconda possibilità è *l'azione demielinizzante immunomediata postinfettiva*. Due sono i meccanismi possibili ipotizzabili: l'infezione di cellule del sistema immunitario con deregolazione dello stesso, a tal punto da indurre autoimmunità (ne è esempio più caratteristico l'infezione non produttiva dei linfociti B ad opera di EBV, con produzione di anticorpi eterofili), oppure il mimetismo molecolare che è stato ipotizzato per un gran numero di patogeni (morbillo, CMV, M. pneumoniae). Terzo e ultimo meccanismo ipotizzato è la deposizione di *immunocomplessi* (più raro): è stato descritto per i capillari della materia bianca del SNC a seguito di infezione rubeolica.

[15]

I patogeni di principale interesse odierno, come cofattori eziologici in SM, sono:

HERPESVIRIDAE: HHV-6: sono segnalati casi di pazienti con alti titoli di questo virus nel siero e liquor. [16, 17, 18, 19] A riprova del suo possibile ruolo eziologico è stato ritrovato DNA virale nelle cellule mononucleate periferiche di pazienti con SM, ma non nei controlli.

[20] Il dato più significativo è la dimostrazione tramite PCR, che il gene per la proteina virus-specifica p101 è presente nel SNC del 36% dei pazienti, mentre nei controlli è presente solamente nel 13% dei casi. [21] Sono però presenti in letteratura lavori che, con analoghi metodi di analisi, non dimostrano alcuna prevalenza di HHV-6 in SM rispetto ai controlli.

[22]

EBV: è presente nel 90% della popolazione, ma studi epidemiologici dimostrano maggiori livelli di IgG sieriche specifiche per EBV e più frequenti infezioni tardive (dopo i 15 anni di età) in pazienti con SM appartenenti ad aree geografiche ad alta incidenza. [23, 24]. Sebbene molti altri herpesvirus siano stati chiamati in causa nella eziopatogenesi di SM a seguito della identificazione di cellule T CD8⁺ ad essi specifici, non ci sono prove del ruolo causale di questi patogeni e la stessa terapia antivirale con valacyclavir non ha dimostrato alcun effetto clinico rispetto al controllo. [25]

HTLV-I: responsabile di paresi spastica tropicale, che consiste in una mielopatia demielinizzante. RNA virus specifico è stato dimostrato in pazienti con SM. [26]

Le stesse sequenze retrovirali sarebbero causa, per interazione con geni dell'ospite, della demielinizzazione. Uno studio recente condotto sulle cellule del siero di 25 pazienti ha evidenziato, mediante PCR, la positività di tutti per sequenze RNA extracellulari codificanti per la proteina *pol*, mentre nei controlli la positività era di 3 su 25. [27]

Molti sono ancora i dubbi sul ruolo svolto da geni provirali nell'induzione della demielinizzazione. Dato certo è che un ambiente tissutale infiammatorio, con presenza di macrofagi, aumenta il tasso di trascrizione di queste stesse sequenze. [28]

CHLAMYDIA PNEUMONIAE: Patogeno intracellulare obbligato; è uno dei pochi agenti infettivi non virali correlabile alla SM, sebbene oggetto di controverse valutazioni sul suo reale significato. La distribuzione geografica della sieroconversione per *C. pneumoniae* è sovrapponibile a quella in cui è presente SM. Dal 1989 al 2001 sono stati segnalati 10 episodi di encefalomielite acuta disseminata, a seguito di infezioni respiratorie con alti titoli anticorpali sierici specifici per *C. pneumoniae*. In tutti questi casi, la malattia neurologica acuta era monofasica. [29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38]. La PCR su liquor di pazienti con SM ha dimostrato la frequente presenza di *C. pneumoniae*: in uno studio del 1999, Balin et al. hanno dimostrato che in pazienti Recidivanti-Remittenti (RR) la coltura su liquor era

positiva nel 47% dei casi e questa positività saliva al 100% con PCR per sequenze virali codificanti specifiche proteine della membrana. Nei pazienti Progressivi invece la positività colturale era dell' 80% e saliva al 95% con la PCR. La positività alla PCR era del 18% tra pazienti neurologici non SM [39], usati come controlli. Molti altri sono gli studi che confermano la significatività di questi risultati [40, 41, 42], a parità di condizioni di PCR utilizzate. [43]. Sebbene la forma clinica di più frequente riscontro sia un' infezione respiratoria, la localizzazione del patogeno può essere ubiquitaria, per la capacità di infettare monociti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce vascolari. Il danno tissutale però è ritenuto essere immunomediato. Si pensa che *C. pneumoniae*, oltre a stimolare una risposta immunitaria adattiva, sia bersaglio anche di una risposta immunitaria innata, conseguente al contatto del suo lipopolisaccaride con i TLR (toll-like receptors) dei macrofagi. [44] Questo scatenerrebbe una pronta risposta infiammatoria, con danno delle strutture mieliniche. Nonostante siano stati ipotizzati molti diversi meccanismi di danno possibili, per *C. pneumoniae*, come per gli altri patogeni, non ci sono spiegazioni certe ed univoche sul reale meccanismo di induzione della demielinizzazione. Sebbene le cellule T siano essenziali nella demielinizzazione, gli oligodendrociti non esprimono MHC-II ed esprimono bassi livelli di MHC-I. [45]

È la creazione di un microambiente fortemente improntato alla flogosi probabilmente il fattore responsabile del danno demielinizzante. Ne sono prova due caratteristiche che si ritrovano nei modelli animali di malattia demielinizzante a seguito di esposizione ad agenti infettivi: la aumentata produzione di IFN- α e della proteina IFN- α inducibile (MxA) da una parte e l'aumentata espressione di MHC-I sugli oligodendrociti dall'altra, con conseguente maggior esposizione al danno citotossico CD8- mediato.

FATTORI IMMUNOLOGICI

Un insieme di dati clinici e sperimentali supportano l'ipotesi che la SM sia una malattia infiammatoria a genesi autoimmune. In particolare, questa ipotesi si fonda sul rilievo neuropatologico, sul riscontro di bande oligoclonali nel liquor e sulla similarità che la SM mostra con un sistema sperimentale animale di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), di certa eziopatogenesi autoimmune.

Nella SM sembra esistere una compromissione dell'attività linfocitaria T regolatoria/soppressoria, che potrebbe essere responsabile di un alterato controllo di cellule potenzialmente autoreattive. Anche i meccanismi umorali dell'immunità sembrano essere coinvolti nel danno nervoso, come suggerito dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor del 90% dei pazienti e dall'importanza che l'amplificazione della risposta anticorpale ha, in corso di dissequestro antigenico, in alcuni tipi di EAE (fenomeno detto di "*epitope spreading*").

C. PATOGENESI

SISTEMA NERVOSO CENTRALE E SISTEMA IMMUNITARIO

Il Sistema Nervoso Centrale (SNC) si è sviluppato come un sito immunologicamente privilegiato. Questa osservazione era già nota dagli studi di Barker [46], che dimostrò in maniera rudimentale, ma efficace, la maggior sopravvivenza di tessuti allotrapiantati nel SNC, rispetto ad altre sedi di impianto.

Oggi, maggiori informazioni permettono di comprendere più nel dettaglio le interazioni esistenti tra SNC e Sistema Immunitario e di capire come alterazioni dei meccanismi che regolano queste interazioni possono essere coinvolte nell'induzione di malattie demielinizzanti immunomediate.

Molteplici sono i meccanismi di elusione del Sistema Immunitario da parte del SNC. Oltre alla barriera emato-encefalica (BEE), vi è l'assenza di linfonodi, la limitata espressione di molecole del Sistema Maggiore di Istocompatibilità (MHC-I e -II), la ridotta espressione di molecole costimolatorie e l'assenza di cellule presentanti l'antigene (APC) nel parenchima cerebrale; è inoltre ipotizzata anche un'attiva soppressione della risposta immunitaria, il tutto a determinare l'effetto comune di creare un ambiente ostile a processi flogistici interessanti il SNC.

Solo nell'ultimo decennio si sono messi in discussione alcuni di questi meccanismi: le cellule T naive e attivate possono passare la BEE ed è stato documentato un drenaggio linfatico del SNC alle catene linfonodali cervicali. [47, 48, 49, 50]

Principale meccanismo alla base della immunoelusione del SNC è costituito dalla contemporanea presenza di giunzioni strette (tight junctions) e giunzioni aderenti (adherent junctions) tra endotelioцитi contigui. In particolare le giunzioni strette si differenziano da quelle di ogni altro tessuto per la stretta associazione che contraggono con il citoscheletro e le giunzioni aderenti, a formare unità funzionali dette complessi giunzionali apicali. [51]

Molti sono i fattori che modificano, specialmente nella SM, la BEE, tanto da rendere evidente la riduzione delle giunzioni strette non solo a livello immunostochimico (riduzione di ZO-1, proteina associata ad occludina, che costituisce la parte centrale della zonula occludens della giunzione stretta), ma anche alla Risonanza Magnetica (MRI) con Ossisolfuro di Gadolinio.

TNF- α [52, 53], IL-1 β [54], IL-6 [55] sono solo alcuni tra i principali mediatori infiammatori causanti aumento della permeabilità della BEE. Oggi vi è concordia nel ritenere che il numero di cellule T capaci di passare la BEE sia elevato, ma che solo quelle capaci di riconoscere antigeni SNC-specifici svolgano un ruolo rilevante nella patogenesi della SM. [56, 57, 58, 59]

Nel sistema sperimentale animale di SM (EAE) si è dimostrato che, tra le cellule Th1 e Th2, solo le prime sono capaci di legare la P-selectina e la E-selectina, due molecole endoteliali essenziali nelle prime fasi di riconoscimento dei T linfociti da parte degli endotelioцити e che anticipano il superamento della BEE. Molte sono le modificazioni di espressione di molecole endoteliali di adesione in corso di flogosi, ma è incerto il loro significato nella patologia umana (Fig.1). Alcuni lavori prospettano che la possibilità di passare la BEE sia una prerogativa esclusiva dei linfociti T con alti livelli di CD44 e bassi livelli di CD62L, caratteri tipici del linfocita T attivato. [60, 61] Viceversa i linfociti T quiescenti sono per lo più esclusi dal SNC [62] a causa dei loro bassi livelli di CD44 e gli alti livelli di CD62L, ma anche se entrassero, la carenza di cellule presentanti l'antigene e la scarsa espressione di MHC nel SNC, renderebbero comunque difficile la loro attivazione.

RUOLO DELLE CELLULE PRESENTANTI L' ANTIGENE (APC) [63]

Nel SNC, le cellule che principalmente svolgono la funzione di cellule presentanti l'antigene (APC) sono microglia, astrociti, periciti, macrofagi perivascolari ed endotelioцити. [64, 65]

Sebbene le cellule dendritiche si siano dimostrate orchestrare il processo di induzione della risposta immune adattiva da parte dei linfociti T attivati in periferia, il loro effettivo ruolo nel SNC è ad oggi controverso. Da una parte è stata documentata la possibilità che queste cellule presentino perifericamente un costituente proteico della mielina (MBP^{Ac1-11}) [66], nei sistemi sperimentali murini (EAE). Dall'altra non vi è ancora la certezza di avere un corrispettivo di cellule dendritiche nel SNC. [67, 68]

È unanimemente condivisa l'ipotesi che i linfociti T autoreattivi subiscano una prima attivazione in periferia, alla quale deve seguire, perché esplicino il loro danno mielinico, una seconda attivazione nel SNC, in cui giocano un ruolo fondamentale interazioni costimolatorie. Tra le più note interazioni costimolatorie vi è quella tra le molecole della famiglia B7 e CD28 o CTL4. B7 è espressa dalle APC ed esiste in due forme: B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), il cui effetto è quello di aumentare l'espressione di IL-2 da parte delle cellule Th. Alcuni autori ritengono che CD80 costimoli l'attivazione Th1, mentre CD86 costimoli la risposta Th2. [69] Certo è che anticorpi neutralizzanti anti-CD80 proteggono l'animale da esperimento dalla comparsa di encefalomielite autoimmune sperimentale, mentre anticorpi neutralizzanti anti-CD86 la esacerbano.

CD28 e CTL4 sono coesprese su linfociti T attivati, ma solo il primo è presente sui linfociti T quiescenti. [70]

Molto più chiaro è il ruolo di microglia e macrofagi perivascolari nella patogenesi delle malattie demielinizzanti del SNC. Le cellule della microglia si caratterizzano per bassi livelli di MHC e per la perdita, una volta dislocati nel SNC, della capacità di presentare l'antigene a linfociti T CD4 naive. I macrofagi perivascolari invece esprimono costitutivamente MHC e sono APC efficaci per i linfociti T naive.

Vi è ormai comune accordo nel riconoscere alla microglia il ruolo principale di APC nel SNC, ruolo di rilievo che può essere importante nella patogenesi di SM, EAE, Alzheimer,

Parkinson e AIDS – dementia complex, in cui è stata documentata l'aumentata espressione di MHC-II proprio dalle cellule microgliali. [71, 72, 73, 74, 75]

IL “SISTEMA Fas/FasL” nella SM

Fas/Apo-1 (CD95) [76] svolge un duplice ruolo nella risposta immunitaria. [77] I linfociti citotossici esprimono FasL, la cui interazione con Fas espresso dalle cellule bersaglio è uno dei meccanismi utilizzati per esercitare la loro funzione citotossica. [78] I linfociti possono anche esprimere Fas ed essere essi stessi bersagli di cellule esprimenti FasL: questa interazione è coinvolta nello spegnimento della risposta immunitaria e nell'induzione della tolleranza periferica.

Entrambe queste funzioni di Fas possono essere coinvolte nello sviluppo delle malattie autoimmuni [79] e in particolare della SM, in modi speculari: da un lato elevati livelli di citotossicità mediata da Fas sono coinvolti nel danno tissutale che si producono nelle malattie autoimmuni cellulo-mediate, dall'altro, una funzione deficitaria del Fas altera i meccanismi di spegnimento della risposta immunitaria favorendo lo sviluppo dell'autoimmunità. [80]

Il coinvolgimento di Fas come effettore di danno tissutale è suggerito dalla osservazione che nelle placche di SM gli oligodendrociti esprimono elevati livelli di Fas e sono circondati da vari tipi di cellule esprimenti elevati livelli di FasL (linfociti T, microglia, macrofagi e astrociti). [81-82] Inoltre topi geneticamente Fas-difettivi mostrano un ritardo nello sviluppo della EAE. [83].

Viceversa, la possibilità che lo sviluppo della SM sia favorito da una ridotta funzionalità di Fas è suggerita dall'osservazione che i sieri dei pazienti con SM spesso contengono elevati livelli di forme solubili del Fas (sFas), le quali potrebbero interferire con la funzione della forma di membrana e inibire lo spegnimento della risposta immune mediata da Fas. [84]

Inoltre vari autori hanno osservato che nei topi Fas-difettivi la EAE tende a sviluppare un decorso progressivo anziché il classico corso RR sviluppato dai topi normali. [85] D'altro canto è stato riportato un alto livello di mRNA codificante per FasL e per TRAIL, nelle cellule mononucleate del sangue periferico dei pazienti con forme RR di SM in fase di remissione, dato a favore del ruolo limitante l'inflammatione di questi due ligandi della famiglia dei recettori TNF. [86]

La forma solubile di FasL (sFasL), naturalmente prodotta dalla scissione mediata dalle metalloproteinasi, induce apoptosi nelle cellule suscettibili, in vitro. Nei linfociti di pazienti con forme RR e SP, dopo stimolo con fitoemoagglutinina (PHA), è stata riscontrata una riduzione sia dell'espressione sia della produzione di FasL rispetto ai controlli sani. In questo stesso studio i livelli di sFasL risultavano inversamente correlati con l'EDSS dei pazienti. [87] Questo potrebbe essere una prova a favore dell'ipotesi che, il rilascio di una forma solubile da parte dei linfociti stimolati, influenzi l'abilità di eliminare i cloni autoreattivi in vivo.

D. CITOCHINE

Sono proteine prodotte da popolazioni cellulari molto diverse, che comprendono linfociti B, T, monociti, macrofagi, NK, eosinofili, basofili, e mastociti, ma anche neuroni, astrociti e microglia.

La loro importanza nella patogenesi della SM è stata definitivamente confermata dopo aver dimostrato che i linfociti T infiltranti il SNC e responsabili del danno demielinizzante appartengono ad un gruppo omogeneo per quanto concerne la produzione citochinica (IL-2, TNF- α e IFN- γ). [88] Tale popolazione è detta Th1 ed è distinta dalla popolazione Th2 che produce IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, il cui aumento coincide con la fase di remissione della malattia, e dai Treg che producono IL-10 e TGF- β .

TNF- α e TNF-R p55: È stato dimostrato l'aumento sierico della citochina proinfiammatoria TNF- α circa due settimane prima della recidiva clinica. Il suo recettore (TNF-R p55) mostra livelli sierici più elevati nella fase di remissione, rispetto alla fase attiva. [89, 90] Nonostante i livelli di p55 non correlino con l'entità delle lesioni nervose, è tuttavia dimostrato un suo aumento nelle forme progressive ed una correlazione con alti gradi dell' EDSS, la scala di valutazione clinica del grado di disabilità. [91]

IL-12: La forma p40 della citochina proinfiammatoria IL-12 è aumentata in pazienti RR e SP, e i suoi livelli correlano con l'entità delle lesioni nervose riscontrabili in risonanza magnetica con ossisolfuro di Gadolinio. [92]. La variante p35 invece è specularmente ridotta. [93]

IL-10: I livelli della citochina antinfiammatoria IL-10 si riducono prima dell'inizio della recidiva nei pazienti RR. [94] Tale riduzione è molto più marcata nei pazienti SP. [95]. Alcuni studi dimostrerebbero più bassi livelli di IL-10 in tutti i pazienti con SM, rispetto ai controlli sani. [96]

IL-4: È una citochina specifica del linfociti Th2 ancora poco studiata in SM. Si dimostra maggiormente prodotta dalle cellule T di pazienti trattati con ciclofosfamide / prednisolone, rispetto ai non trattati. [97] Questi farmaci infatti favorirebbero la risposta Th2, oltre ad avere un generico effetto immunosoppressivo.

INTERFERONI

Scoperti nel 1957 come proteine prodotte da cellule di vario tipo infettate da virus. L' IFN- α è prodotto principalmente da linfociti e macrofagi infettati da virus. IFN- β , strutturalmente analogo all' IFN- α per il 40%, è prodotto dai fibroblasti, mentre IFN- γ non è strutturalmente analogo ai precedenti ed è prodotto dai linfociti, soprattutto helper.

L' IFN- γ è conosciuto essere un mediatore citochinico Th1 caratteristico e i suoi livelli aumentano nelle fasi acute della malattia. In un unico studio che ne ha valutato l'uso nella terapia della SM si è osservato che ha effetti dannosi in quanto aumenta il rischio di recidive, osservate in ben il 10% dei pazienti trattati. [98, 99, 100]

IFN- α e β invece sono largamente usati nel trattamento di SM e soprattutto il secondo si è dimostrato efficace. Sebbene la sua effettiva farmacodinamica sia sconosciuta, i meccanismi di azione più rilevanti ad esso riferiti consistono in:

1. inibizione della presentazione antigenica da parte delle APC [101], probabilmente per inibizione della capacità di processare l'antigene o per riduzione di espressione delle molecole costimolatorie B7.1 e CD40:
2. Aumento di espressione di induttori di apoptosi quali Fas/CD95 sui linfociti T anti-MBP specifici. [102]
3. Inibizione di citochine Th1 specifiche (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) [103, 104, 105, 106, 107, 108] con aumento delle Th2 specifiche (TGF- β , TNFR1 e 2). [109, 110]
4. Riduzione di molecole di adesione sull' endotelio del SNC, quali VLA-4.

E. MODELLI SPERIMENTALI

L'encefalomielite sperimentale autoimmune (EAE) è un ben caratterizzato modello animale sviluppato nel 1981 [111] ed utilizzato estensivamente per lo studio dei meccanismi immunopatologici responsabili della SM. In realtà, già agli inizi del '900 era nota una patologia simile alla SM, detta encefalomielite post-vaccinica, che colpiva soggetti vaccinati contro la rabbia. Il vaccino era allora ottenuto da omogenati di tessuto cerebrale infetto inattivato, poco o per nulla purificato.

Iniettando estratti proteici di origine mielinica in vivo, è possibile generare una risposta immunitaria diretta contro la mielina dell'ospite, inducendo un danno demielinizzante del tutto simile a quello presente nella SM. Le proteine mieliniche più immunogeniche sono la Proteina Basica della Mielina (MBP), la Proteina ProteoLipidica (PLP) e la Proteina Mielinica Oligodendrocitica (MOG) .

A differenza della SM, l'eziopatogenesi della EAE è ormai nota: sottende alla presenza di linfociti Th CD4+ di tipo 1, specifici per antigeni mielinici. [112] Se questo tipo cellulare è essenziale, non è però sufficiente allo sviluppo dell' EAE in quanto hanno un ruolo anche linfociti Th2, linfociti T CD8+, macrofagi, linfociti B e cellule NK, che svolgono un'azione attivo e concertata per ottenere il danno demielinizzante.

La possibilità di indurre la stessa malattia tramite il trasferimento di linfociti splenici o di linfonodi da un animale con EAE ad un altro singenico ha confermato il ruolo centrale dei linfociti nella patogenesi della malattia. [113] La prevenzione della malattia in questi stessi animali attraverso la somministrazione di anticorpi monoclonali per i linfociti T CD4+ (Lyt 1+2-T), ha permesso poi di identificare il tipo cellulare principale responsabile della reazione autoimmune.

Nel modello di EAE si è studiato il significato favorente o protettivo di diversi alleli delle molecole MHC di classe II. Si è così osservato che alcune varianti alleliche (per es. H-2u, s,

q, k per la EAE indotta da MBP) favoriscono l'insorgenza della malattia perché legano con maggiore affinità sia i peptidi autoimmuni sia i TCR autoreattivi.

Nelle placche attive di demielinizzazione sperimentale si è dimostrata l'aumentata espressione di citochine proprie della risposta Th1, comprendenti IFN- γ , TNF- α e IL-2. È stata dimostrata in queste stesse sedi anche l'aumentata espressione di chemochine (MCP-1, RANTES, MIP-1 α , IP-10) [114] e di loro recettori (CCR1, CCR2, CCR5). [115] La loro importanza è stata dimostrata dalla regressione in vivo della EAE a seguito dell'infusione di anticorpi diretti contro queste chemochine. In particolare, i brillanti risultati ottenuti con anticorpi anti-MCP-1 hanno indotto a pensare che questa chemochina sia un promettente bersaglio per la prevenzione e cura della recidiva di SM.

Più recenti modelli sperimentali in vivo, consistono nell'inserimento nel genoma murino di geni già riarrangiati per un TCR specifico per peptidi della MBP. [116] L'incrocio di questi topi con topi knockout per RAG-1, gene essenziale al riarrangiamento dei geni del TCR e delle immunoglobuline, permetterà di selezionare una progenie che esprima il TCR anti-MBP, ma che sia incapace di riarrangiare qualsiasi altro TCR alternativo a quello autoreattivo. Ne risulta un modello animale murino che sviluppa una forma di EAE spontanea.

OSTEOPONTINA (OPN)

A. IL GENE E LA MOLECOLA

Osteopontina (Opn) è una fosfoproteina di 60 kDa codificata da un gene multiallelico localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (117). Essa è coinvolta in molteplici e disparati processi fisiologici (per es. rimodellamento osseo, mantenimento dell'integrità e rigenerazione dei tessuti lesionati) e patologici (per es. tumori, aterosclerosi, infiammazione e immunità). La sua espressione è basale e costitutiva nel tessuto epiteliale ed osseo, mentre nelle cellule della muscolatura liscia, nei macrofagi e negli endoteli è iperespressa in seguito ad eventi infiammatori. Esistono diverse forme funzionalmente distinte di Opn dovute ad una diversa regolazione trascrizionale (le uniche due isoforme di splicing alternativo nella molecola umana coinvolgono l'esone 4 e 5) e maturazione post-traduzionale (fosforilazione e glicosilazione). Opn può essere considerata una proteina della Matrice ExtraCellulare (ECM) a causa del dominio RGD (Arginina Glicina Aspartato), un tipico dominio di legame alle integrine. Tuttavia, nonostante il dominio RGD, essa non si trova associata con la matrice extracellulare, fatta eccezione per il tessuto osseo. La sua attività può essere modulata dalla trombina grazie ad un sito di taglio per l'enzima vicino alla sequenza RGD. Conseguentemente al taglio dell'enzima vengono infatti esposti i siti di legame del recettore posti all'estremità N-terminale, determinando un cambiamento conformazionale che si riflette sulla funzionalità della molecola. Gli effetti di Opn sono mediati dall'interazione con i suoi recettori, tra i quali le integrine appartenenti al sottogruppo α_v e β_1 e le isoforme v6 e v10 di CD44; la prima è un'interazione RGD-dipendente, la seconda RGD-indipendente.

B. OSTEOPONTINA E RISPOSTA IMMUNITARIA

Sebbene identificata nel 1979, il suo coinvolgimento nella risposta immunitaria è stato descritto solo negli ultimi anni. Essa infatti esiste non solo come proteina della matrice extracellulare nel tessuto osseo, ma anche come citochina nei fluidi biologici, agendo come nuovo ed importante attore nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria. Sembra che Opn abbia un ruolo nel reclutamento e nell'attivazione dei leucociti e nella produzione di citochine, entrambi eventi critici nelle fasi precoci dell'immunità cellulare e nell'infiammazione. In particolare è stato proposto che Opn sia coinvolta nella regolazione della migrazione e della funzione delle cellule infiammatorie nei siti sede di infiammazione (118, 119). Un aumento della trascrizione di Opn, spesso attraverso il coinvolgimento della PKC, può essere indotto da parecchi mediatori dell'infiammazione e fattori di crescita, tra i quali NO, IL-1, TNF- α , PDGF (119). Opn è una molecola con un duplice ruolo, pro- ed anti-infiammatorio. Per quello che riguarda la sua azione pro-infiammatoria, dati in vitro mostrano che può agire come agente chemoattrattivo, che favorisce l'adesione dei macrofagi e modula la funzione di macrofagi e linfociti T (120). Analogamente, dati in vivo mostrano che la somministrazione sottocutanea di Opn induce richiamo locale di macrofagi (121). Il suo ruolo nella chemotassi e migrazione macrofagica avviene probabilmente attraverso interazioni dirette con componenti intracellulari e modulando l'espressione delle metalloproteinasi della matrice. In vitro, gli effetti di Opn sulla migrazione e sulla adesione dei macrofagi, sono mediate sia dall'interazione con le integrine (RGD dipendenti) che con CD44 v6 e v10 (RGD indipendenti) (122). L'effetto di adesione RGD dipendente è potenziato dal taglio con l'enzima trombina.

Opn esercita anche un ruolo anti-infiammatorio inibendo, in vitro, l'enzima iNOS (*inducible NO Synthase*) e riducendo la produzione di NO da parte dei macrofagi e delle

cellule epiteliali del tubulo renale (123). L'espressione vasale di Opn aumenta infatti durante la sepsi inibendo la sintesi di NO e la produzione dei suoi metaboliti (124). NO è un mediatore degli eventi infiammatori e stimola l'espressione di Opn che a sua volta inibisce la sintesi di NO creando un sistema autoregolativo (125).

Opn è espresso da molteplici cellule immunitarie quali linfociti T, cellule NK e macrofagi (126). Originariamente è stata identificata come Eta-1 (Early T cell Activation) perché è iperespressa nelle fasi precoci delle infezioni intracellulari (entro le 48 ore dall'infezione) (127). La risposta immunitaria cellulo-mediata di tipo Th1 è necessaria per la protezione contro la maggior parte dei patogeni intracellulari, ma quando eccessiva può determinare un danno autoimmune. Fondamentale per questo tipo di risposta è la produzione da parte dei macrofagi di IL-12 e IFN- γ e l'inibizione della produzione di IL-10 (128). Un gene che potrebbe avere un ruolo decisivo nella sintesi di IL-12 nelle risposte di tipo 1 è proprio Opn. Topi KO per Opn mostrano una risposta di tipo 1 ridotta in seguito alle infezioni da patogeni intracellulari virali (es. HSV-1) e batterici (*Listeria monocytogenes*); inoltre, la produzione di IL-12 è inferiore ai controlli, mentre è aumentata la produzione di IL-10 (129). Opn sembra quindi essere decisiva nello stimolare la produzione macrofagica di IL-12 e nell'inibire quella di IL-10. L'interazione Opn-macrofagi è mediata da due tipi di recettori, le integrine e CD44. L'interazione Opn-integrine, oltre a determinare adesione, stimola la produzione macrofagica di IL-12; l'interazione Opn-CD44 determina invece la migrazione chemotattica e l'inibizione nella sintesi di IL-10 da parte dei macrofagi (129). Inoltre Opn viene secreta in una forma fosforilata e in una non fosforilata e la fosforilazione in serina è fondamentale per la stimolazione della sintesi di IL-12, ma non nell'inibizione della sintesi di IL-10. (129). Opn stimola i linfociti T attivati ad esprimere CD40L e IFN- γ , e quest'ultimo induce a sua volta l'espressione da parte dei macrofagi di CD40, la cui interazione con CD40L sui linfociti induce i macrofagi a sintetizzare IL-12

(130). Questi dati suggeriscono che Opn sia una citochina importante nello sviluppo della risposta immunitaria cellulo-mediata.

C. OSTEOPONTINA E MALATTIE AUTOIMMUNI

I topi MRL lpr/lpr sono portatori di una mutazione in omozigosi sul recettore Fas e rappresentano un modello murino dell'autoimmunità; studi condotti su topi di questo ceppo dimostrano una iperespressione di Opn nelle fasi precoci della malattia (131). Due evidenze sostengono l'ipotesi che l'elevata espressione di Opn contribuisca all'ipergammaglobulinemia caratteristica della fase precoce di questa malattia nei topi. Primo, Opn stimola, in vitro, l'attivazione policlonale dei linfociti B attraverso il suo effetto sulla produzione di IL-12 (132). Secondo, l' iperespressione di Opn da parte dei linfociti B ne determina l'espansione clonale e la secrezione di immunoglobuline (133). Questi dati suggeriscono che Opn possa essere coinvolta nella patogenesi di questa malattia.

Elevate espressioni di Opn si sono riscontrate nell'uomo sia nell'artrite reumatoide che nell'osteoartrite a livello del liquido sinoviale delle articolazioni. Coerentemente con quanto affermato in precedenza, anche in questo caso Opn sembra avere un duplice effetto. Il suo effetto antinfiammatorio sembra quello di inibire la produzione di NO e di prostaglandine E₂. Proprio NO, insieme a IL-1 sembra essere tra i principali responsabili dell'elevata espressione di Opn, dal momento che i macrofagi, nonostante siano numericamente molto presenti a livello articolare, esprimono, in questo contesto, solo in parte Opn. Nell'artrite reumatoide Opn sembra infatti essere espressa essenzialmente dai fibroblasti sinoviali della cartilagine. La sua azione proinfiammatoria consiste invece nello stimolare l'espressione della metalloproteinasi 1 della matrice e nello scatenare l'invasività dei macrofagi e dei condrociti articolari (134).

Nell'uomo il cDNA di Opn presenta 11 polimorfismi (*Single Nucleotide Polymorphisms=SNPs*): 1 nell'esone VI e 10 nell'esone VII (in particolare 2 nella regione

codificante e 8 al 3'UTR) (135). Lo studio dei polimorfismi di Opn ha portato ad interessanti associazioni con alcune patologie. La prima associazione di un polimorfismo di Opn con una patologia è rappresentata dallo studio di Forton et al. condotto nel 2002, in cui si dimostra un'associazione dello SNPs 1126616C>T (posizione +750 sul cDNA, esone 7) con il lupus eritematoso sistemico (LES).

Il possibile ruolo di OPN nella patogenesi della sclerosi multipla è stato oggetto di grande attenzione e di intensa ricerca.

L'analisi di una *library* di cDNA ottenuta dalle placche dissezionate da cervelli di pazienti con SM, ha indicato Opn come uno dei trascritti più abbondanti (136). Questi risultati sono stati confermati dallo stesso gruppo di lavoro utilizzando microarray sulla corda spinale di topi con EAE. Nelle placche attive e nella materia bianca contigua OPN risulta espressa da parte delle cellule endoteliali del microcircolo e dei macrofagi, oltre che di astrociti e microglia reattivi al danno immunomediato primario.

L'interesse per OPN è stato rafforzato dalla dimostrazione del ruolo chiave di questa citochina nella patogenesi di EAE, con un suo spiccato aumento sia nella fase di recidiva che di remissione ad opera della microglia nella regione perilesionale e dei neuroni durante la sola fase di recidiva. A conferma di questi dati vi è la resistenza in topi OPN^{-/-} allo sviluppo di EAE indotta mediante immunizzazione con il MOG [137], un costituente proteico minore della mielina che induce una demielinizzazione, almeno in parte, anticorpo-mediata [138, 139, 140].

Un altro studio ha dimostrato che i livelli sierici di Opn sono più alti nei pazienti con la forma RR di MS rispetto a quelli con forma SP e PP. Inoltre, all'interno del gruppo RR, i pazienti in fase acuta presentavano livelli più elevati di quelli in remissione [141].

Successivamente a questi dati iniziali che mostrano una correlazione tra proteina e malattia, uno studio sulla popolazione giapponese è stato il primo a correlare alcuni polimorfismi del

gene OPN/Eta-1 con il rischio e l'età d'esordio della SM. [142] I polimorfismi studiati sono tre: T/C rs 4754 (SNP1) nell'esone 6, C/T rs 1126616 (SNP2) nell'esone 7 e A/G rs 1126772 (SNP3) nel 3' UTR. I risultati di questo studio hanno mostrato una significativa prevalenza dell'allele C-SNP1 nei pazienti, rispetto ai controlli (85,3% vs 69,4% , $p < 0,0001$), mentre gli altri due alleli non si sono dimostrati differenti per incidenza tra pazienti e controlli. A fronte di un'età media d'esordio dei sintomi di $26,3 \pm 9,2$ anni del campione giapponese, lo studio dimostra che i pazienti con polimorfismo G-SNP3 hanno un'età di insorgenza sensibilmente più tardiva ($32,1 \pm 12,5$ anni). Non viene considerato il ruolo di questi tre polimorfismi nella severità di progressione della malattia.

Un secondo studio, avente per oggetto 821 pazienti americani di origine caucasica con SM, ha valutato il significato dei precedenti tre polimorfismi, ai quali ne è stato aggiunto un quarto, A/C rs 9138 (SNP4) in 3' UTR (143). I dati di associazione tra questi polimorfismi di Opn e la SM ottenuti in questo studio dimostrano un *trend* consistente in una più bassa probabilità dei pazienti con l'allele A-SNP4 di avere un decorso lieve di malattia e in un maggior rischio di sviluppare una forma SP. Analoghi risultati si osservano per C-SNP1. Nonostante l'assenza di significatività statistica, gli autori americani ipotizzano un verosimile ruolo di OPN nella patogenesi di SM, visto il crescente corpus di evidenze di associazione in popolazioni etnicamente tra loro indipendenti.

Tutti gli studi precedenti hanno dimostrato separatamente alti livelli di OPN nella fase di recidiva clinica o la correlazione tra polimorfismi di OPN e la malattia, ma nessuno di questi lavori ha indagato la possibile associazione tra polimorfismi e livelli sierici della proteina.

L'insieme di questi dati ci spinge a valutare il significato degli aplotipi di OPN nello sviluppo e nella progressione della SM in pazienti italiani, correlando i dati genotipici ai livelli sierici della proteina.

ICOS (INDUCIBLE COSTIMULATOR)

A. IL GENE E LA MOLECOLA

H4 è una molecola originariamente identificata nel nostro laboratorio ed espressa in membrana dai linfociti T umani e murini attivati (144-145). Successivamente è stato descritto il clonaggio di una molecola espressa selettivamente dai linfociti T attivati e correlata strutturalmente e funzionalmente a CD28 denominata ICOS (Inducible T cell Costimulator) (146). Il nostro laboratorio ha dimostrato che H4 e ICOS sono la stessa molecola (147). E' una molecola transmembrana di tipo I costituita da 199 aminoacidi ed espressa sotto forma di monomero oppure di omodimero; la forma dimerica ha un peso molecolare di circa 55-60 kDa mentre ogni singola catena pesa circa 27-29 kDa (148).

Il gene che codifica per ICOS è approssimativamente lungo 25 kb e mappa nella regione cromosomica 2q33 insieme ai geni per CD28 e CTLA-4; questi tre geni sono funzionalmente correlati e appartengono alla famiglia molecolare di CD28 con il quale ICOS ha un'identità di sequenza aminoacidica di circa il 19% nel topo e di circa il 24% nell'uomo e una similarità di sequenza di circa il 39% nell'uomo (148). Il gene di ICOS è polimorfico ed è costituito da 5 esoni e 4 introni. Gli esoni 1, 2 e 3 codificano rispettivamente per la sequenza leader, il dominio extracellulare e il dominio transmembrana, mentre gli esoni 4 e 5 codificano per il dominio intracellulare .

B. ICOS E RISPOSTA IMMUNITARIA

I linfociti T rappresentano un importante componente cellulare del sistema immunitario e sono caratterizzati dall'espressione in membrana del TCR (T Cell Receptor) e dei corecettori CD4 o CD8. Il TCR rappresenta il recettore per l'antigene dei linfociti T maturi ed è costituito dall'associazione di 2 catene polipeptidiche denominate α e β (o meno frequentemente γ e δ unite tra loro da ponti disolfuro). Il TCR non riconosce l'antigene (in genere un peptide) libero in soluzione, ma solo legato a particolari molecole denominate MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità); le molecole MHC sono espresse in membrana da cellule che hanno la funzione di presentare l'antigene ai linfociti T definite APC (Antigen Presenting Cell). Le cellule APC professioniste sono rappresentate da linfociti B, cellule dendritiche e macrofagi ed esprimono costitutivamente molecole MHC, ma esistono altri tipi cellulari che possono essere indotte ad esprimere molecole MHC, e quindi a funzionare da cellule APC, in seguito a stimoli infiammatori di varia natura.

L'attivazione dei linfociti T richiede due distinti segnali, uno costituito dal legame del complesso MHC-antigene espresso dalle cellule APC con il TCR del linfocita T (segnale 1), l'altro costituito dal legame delle molecole costimolatorie espresse sulla superficie delle cellule APC con specifici recettori espressi dai linfociti T (segnale 2). Il ruolo delle molecole costimolatorie è essenziale in quanto la trasmissione del segnale 1 in assenza del segnale 2 non solo non attiva i linfociti T, ma induce uno stato di anergia clonale o la morte cellulare per apoptosi del linfocita. (149).

La corretta definizione di molecola costimolatoria è quella di un recettore di membrana che non è in grado di attivare di per sè un linfocita T, ma piuttosto di potenziare o inibire il segnale attivatorio originatosi dal complesso del TCR (150). Recettori di membrana che sono coinvolti nell'adesione dei linfociti T, ma non nella modulazione del segnale del TCR

non sono considerati costimolatori. La maggioranza delle molecole costimolatorie appartengono alla superfamiglia di CD28/B7 o a quella del TNF/TNFR. Alcuni sono espressi costitutivamente ed hanno solo funzione stimolatoria, altri sono invece esposti in membrana in seguito all'attivazione cellulare indotta dalla stimolazione antigenica, e possono avere effetto stimolatorio, ma in certi casi anche inibitorio. La molecola costimolatoria per eccellenza è CD28, espresso costitutivamente dai linfociti T ed in grado di legare le molecole B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) espresse basalmente dalle cellule APC attivate (151). Il segnale mediato da CD28 sinergizza con quello trasdotto dall'attivazione del TCR e induce una serie di modificazioni cellulari tra cui la trascrizione di IL-2 e l'espressione della catena α del recettore per IL-2 (CD25), il che determina attivazione, espansione clonale e sviluppo dell'attività effettrice del linfocita. (152). Della stessa famiglia di CD28 fa parte anche CTLA-4, una molecola espressa sulla membrana del linfocita T in seguito all'attivazione e che regola negativamente l'attivazione linfocitaria competendo con CD28 per gli stessi ligandi (B7.1 e B7.2) (153).

ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia di CD28 e, contrariamente a CD28, è espresso solo in seguito all'attivazione. L'espressione costitutiva di CD28 suggerisce che sia essenziale nelle fasi iniziali dell'attivazione linfocitaria, mentre la natura inducibile di ICOS sembra renderlo importante in fasi successive. Inoltre sembra che tra le due molecole ci sia un rapporto di tipo gerarchico, in quanto il costimolo di CD28 potenzia notevolmente l'espressione di ICOS (154). Questa dipendenza sembra non essere tuttavia assoluta, infatti ICOS può essere indotto anche in assenza di CD28, sebbene in minor misura (155). La sua espressione è ristretta ai linfociti T ed è rapidamente indotto nelle prime fasi della differenziazione su entrambe le sottopopolazioni linfocitarie Th1 e Th2. La stimolazione di ICOS avviene tramite interazione con il suo ligando B7h (GL50 o B7RP1) espresso costitutivamente da certe APC come linfociti B e macrofagi; viceversa ICOS non interagisce

con B7.1 e B7.2 che sono ligandi di CD28/CTLA-4. Diversamente da B7.1. e B7.2, B7h può essere espresso anche da cellule non immunitarie, come cellule endoteliali, epiteliali e fibroblasti, in seguito a stimoli di natura infiammatoria (156). Questo dato potrebbe indicare una sostanziale e fondamentale differenza tra il costimolo mediato da CD28 e quello mediato invece da ICOS. La costimolazione mediata da ICOS potrebbe infatti essere predominante a livello periferico, dove le molecole costimolatorie B7.1 e B7.2 sono meno espresse, mentre quella di CD28 a livello degli organi linfoidi centrali ad opera delle molecole B7.1 e B7.2 espresse dalle APC. Alternativamente, e' possibile che la costimolazione dei linfociti T naive differisca sostanzialmente da quella dei linfociti T che hanno già incontrato l'antigene, sia a livello centrale che periferico. In linea con tale ipotesi ICOS potrebbe essere importante nell'indurre un costimolo ai linfociti recentemente attivati o linfociti memoria e CD28 potrebbe essere invece importante nell'indurre un costimolo per l'attivazione dei linfociti T naive.

Contrariamente ad altri membri della famiglia di CD28, l'interazione ICOS-ICOSL sembra essere esclusiva, dal momento che i topi Knock Out (KO) per ICOSL presentano un fenotipo sovrapponibile a quello dei topi KO per ICOS (157).

L'interazione di ICOS con B7h, come anche quella di CD28 con B7.1/2, determina anche un aumento dell'espressione di CD40L sulla superficie del linfocita T, la cui interazione con CD40 espresso costitutivamente su tutte le APC professionali, potenzia, a sua volta, l'espressione di B7.1/2 e di ICOS-L, amplificando il segnale dello stesso ICOS e di CD28 (158).

La costimolazione mediata da ICOS induce la produzione di un'ampia gamma di citochine, fatta eccezione che per la IL-2 e IL-9 (159). La gamma di citochine prodotte è in parte diversa nell'uomo e nel topo. Infatti nel topo la stimolazione di ICOS induce una prevalente

produzione di IL4 e favorisce la differenziazione Th2, mentre nell'uomo viene indotta una prevalente produzione di IFN γ e IL10 e sembra prevalere la differenziazione Th1. In linea con queste differenze, ICOS è espresso a livelli più elevati dai linfociti Th2 nel topo e dai linfociti Th1 nell'uomo.

I linfociti T attivati mediante costimolazione con ICOS, a causa dell'incapacità da parte del costimolo di indurre la sintesi di IL2 sono incapaci di proliferare a lungo termine e vanno incontro ad apoptosi dopo circa 3-5 divisioni cellulari (160). La costimolazione selettiva di ICOS al posto di CD28 a livello periferico conferirebbe funzioni effettrici alle cellule T senza tuttavia indurre attivazione e proliferazione a lungo termine (dovuta alla mancanza di IL-2), riducendo quindi il rischio di insorgenza di reazioni autoimmuni. (161). Altre osservazioni indicano che la stimolazione di TCR e ICOS sui linfociti Th in assenza di IL-2 favorirebbe la differenziazione di linfociti T regolatori/soppressori, capaci di inibire la risposta immunitaria.

Il topo KO per ICOS mostra una diminuita proliferazione e produzione di IL-2, il che suggerisce che ICOS sia coinvolto nell'attivazione e nella differenziazione dei linfociti T; questo topo mostra anche un deficit nella risposta di tipo umorale e nello sviluppo dei centri germinativi accompagnato ad una marcata riduzione nella produzione di IL-4, il che sottolinea invece il ruolo di ICOS nelle funzioni effettrici dei linfociti T, in particolare nelle fasi finali della maturazione dei linfociti B, che avviene proprio a livello dei centri germinativi. In modo analogo, topi KO per B7-h indicano che B7-h è necessario per un'adeguata attivazione e differenziazione dei linfociti T e per l'espressione di citochine effettrici. Nell'uomo la mancanza di ICOS, conseguentemente ad una mutazione in omizigosi che ne abolisce l'espressione in membrana, è stata associata con lo sviluppo di rari casi di immunodeficienza comune variabile. I linfociti T di questi pazienti non presentano

anomalie per quel che riguarda l'attivazione e la produzione citochinica, ma mostrano invece una riduzione del numero di linfociti B naive e memoria, suggerendo che ICOS abbia un ruolo chiave nella differenziazione di linfociti B e nella generazione di cellule memoria T mediata. (162). Questi dati indicano una sostanziale differenza tra il fenotipo del topo KO per ICOS e quello di questi pazienti, suggerendo che il ruolo di ICOS potrebbe essere diverso nelle due specie.

C. ICOS E LE MALATTIE AUTOIMMUNI

La regione cromosomica 2q33, contenente in geni di CD28, ICOS e CTLA3, è stata associata in molti studi a malattie autoimmuni comuni quali le tiroiditi, la sclerosi multipla, il diabete mellito e malattie immuno-mediate quali il morbo celiaco.

La maggior parte degli studi genetici sulle molecole della regione 2q33 riguarda l'associazione di vari SNPs di CTLA-4 con diverse malattie autoimmuni quali il diabete mellito, la malattia di Graves, la malattia di Hashimoto, la Miastenia gravis (163, 164, 165, 166). Inoltre topi KO per CTLA-4 sviluppano una forma di autoimmunità letale precoce (167). L'inibizione di CTLA-4 mediante anticorpi in topi con EAE all'esordio clinico (la forma analoga della sclerosi multipla nel topo) determina un peggioramento della malattia e un aumento della mortalità (168, 169), mentre il trattamento con anticorpi agonisti di CTLA-4 previene la comparsa della malattia e ne migliora il quadro clinico (170, 171). CTLA-4 ha un ruolo inibitorio nell'attivazione dei linfociti e controbilancia l'effetto attivatorio di CD28; mutazioni o polimorfismi che diminuiscono l'espressione e/o l'attività di CTLA-4 (o che aumentano l'espressione e/o attività di CD28) possono rappresentare un fattore di rischio genetico che predispone alle malattie autoimmuni.

Recentemente sono stati pubblicati diversi lavori inerenti il possibile coinvolgimento di ICOS nelle malattie autoimmuni, sia dal punto di vista genetico che funzionale. La Miastenia Gravis (MG) è una malattia autoimmune caratterizzata da debolezza e fatica muscolare dovuta ad una difettiva trasmissione neuromuscolare causata da autoanticorpi diretti verso i recettori nicotinici dell'acetilcolina. Esperimenti condotti sui topi KO per ICOS, mostrano una marcata resistenza allo sviluppo della Miastenia Gravis Autoimmune Sperimentale (EAMG), il modello murino della malattia, suggerendo un suo coinvolgimento nell'induzione della malattia. La ragione principale di questa resistenza sembra essere una sostanziale diminuzione nello switch isotipico, nella produzione di autoanticorpi verso il

recettore dell'acetilcolina e un difetto nella produzione delle citochine di tipo sia Th1 che Th2, comprese IL-10 e INF-gamma (172). Entrambi i tipi di citochine sono indispensabili per lo sviluppo dell'EAGM, e ICOS sembra essere un importante punto di controllo per la differenziazione dei linfociti nelle due sottopopolazioni durante lo sviluppo dell'EAGM.

ICOS è importante anche nello sviluppo della miocardite acuta, una patologia mortale caratterizzata da una cardiomiopatia di probabile origine autoimmune. In particolare, studi condotti sui topi immunizzati per indurre la miocardite autoimmune sperimentale (EAM), mostrano come il blocco della via di ICOS durante la fase effettrice della risposta immunitaria attenui lo sviluppo della malattia. Inoltre il blocco di ICOS inibisce la proliferazione indotta dall'antigene e la produzione di citochine quali IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a, IL-1b, INF-gamma (173).

Il ruolo di ICOS è stato studiato anche nell'Artrite Reumatoide (AR) tramite l'impiego di modelli animali con Artrite Indotta da Collagene (CIA). Si è osservato che i topi KO per ICOS e con un particolare background genetico erano completamente resistenti all'induzione della CIA, probabilmente grazie alla ridotta produzione ICOS-mediata della citochina proinfiammatoria IL-17, il cui effetto deleterio a livello delle cartilagini articolari viene appunto a mancare (174). Oltre ai dati ottenuti sul topo, ci sono anche evidenze nell'uomo che suggeriscono come ICOS possa essere coinvolto nell'immunopatogenesi della AR influenzando la risposta immunitaria a livello delle articolazioni nei pazienti (175). In particolare, si è evidenziato un aumento dell'espressione di ICOS nei linfociti T CD4+ e CD8+ del liquido sinoviale dei pazienti con AR rispetto ai linfociti T del sangue periferico degli stessi, e un aumento di espressione nei linfociti T CD8+ dei pazienti rispetto ai linfociti T CD8+ dei controlli. Inoltre, il costimolo mediato da ICOS è chiaramente associato con la produzione di INF-gamma, IL-4 e IL-10 da parte dei linfociti T CD4 del liquido sinoviale .

Il Lupus Eritematoso Sistemico è una malattia autoimmune sistemica caratterizzata da una iperattivazione della componente umorale del sistema immunitario che porta alla produzione di autoanticorpi e alla deposizione di immunocomplessi a livello degli organi sopra menzionati. Elevati livelli di espressione di ICOS sono stati riscontrati sui linfociti CD4+ e CD8+ nei pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES), insieme ad una ridotta espressione di L-ICOS sui linfociti B del circolo periferico. Una diminuita espressione di L-ICOS potrebbe essere dovuta ad una recente interazione con il suo recettore ICOS, e un' aumentata interazione ICOS-ICOSL può portare ad una iperattivazione della componente umorale della risposta immunitaria tipica del LES. Inoltre l'attivazione dei linfociti T da sangue periferico di pazienti con LES attivati con anti-CD3 e anti-ICOS ha mostrato una aumentata produzione di IL-2 e di anticorpi anti-dsDNA e di IgG totali rispetto ai controlli sani. Aumentati livelli di ICOS sui linfociti T CD4+ e CD8+ periferici, associati al decorso clinico della malattia e ai livelli sierici di immunoglobuline e di anticorpi anti-dsDNA, sono stati rilevati anche da Zhonghua YX. et al. (176).

I microsatelliti dell'introne 4 di ICOS sono stati oggetto di indagine in studi di associazione con malattie autoimmuni quali il diabete mellito nella popolazione giapponese e le tiroiditi autoimmuni nella popolazione americana e hanno dato riscontro negativo (177, 178, 179). Recentemente uno studio finlandese ha pubblicato l'associazione tra alcuni polimorfismi di ICOS e il morbo celiaco (180).

Esistono inoltre numerosi studi che correlano ICOS alla Sclerosi Multipla e alla EAE.

In seguito all'induzione dell'EAE in topi SJL con la proteina proteolipidica (PLP), ICOS e ICOSL vengono iperespressi dai linfociti T CD3+ che infiltrano il sistema nervoso centrale (SNC) prima della comparsa della malattia. L'impiego di anticorpi anti-ICOS per inibire l'interazione con il suo ligando ha un diverso effetto sul quadro clinico degli animali, a seconda del momento in cui l'inibizione avviene: se l'inibizione avviene nelle fasi iniziali

(1-10 giorni dall'immunizzazione con PLP) si ha un peggioramento della malattia (aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie e chemochine nel SNC, aumento dell'infiltrazione di cellule B/T, macrofagi e neutrofili nel SNC), se invece avviene nelle fasi effettrici della risposta immunitaria (9-20 giorni dall'immunizzazione) si ha un miglioramento della malattia sia a livello sintomatologico che a livello di parametri immunologici cellulari e molecolari (181). È stato proposto che il blocco di ICOS nelle fasi iniziali della risposta immunitaria determini un aumento del rapporto Th1/Th2 e una maggiore produzione di INF- γ . L'EAE è una malattia Th1-mediata e una polarizzazione verso un fenotipo Th1 determina un peggioramento della malattia. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti con il KO di ICOS sui topi EAE (182). Viceversa la remissione clinica della malattia causata da un blocco tardivo di ICOS sarebbe associata ad una minore proliferazione linfocitaria, espressione di INF- γ e di altre citochine/chemochine e infiltrazione di leucociti nel SNC.

Simili risultati hanno ottenuto Sporici e collaboratori dimostrando che bloccando la via costimolatoria di ICOS con anticorpi in topi con EAE già in corso si ottiene un miglioramento clinico (183).

Nell'EAE, i linfociti T antigene specifici (cioè PLP-specifici) che si trovano nelle lesioni del cervello sono meno del 4% e sono essenzialmente Th1 che agiscono reclutando altri leucociti non antigene specifici. Nel lavoro di Rottmann e collaboratori, si è dimostrato che linfociti T ICOS⁺ si trovano nelle lesioni del cervello dei topi EAE prima ancora che si manifesti la malattia e che, almeno in parte, questi linfociti sono PLP-specifici. È probabile che bloccando la via costimolatoria di ICOS si inibisca l'attivazione e la proliferazione di queste cellule T encefalitogeniche e quindi il successivo reclutamento di leucociti non antigene specifici. Le cellule che nel SNC potrebbero esprimere ICOSL sono astrociti e microglia, dal momento che sono in grado di attuare una costimolazione Th1 e Th2

indipendentemente dall'espressione di B7.1/2 (184). La costimolazione di ICOSL fornisce un segnale proliferativo anti-apoptotico alle cellule encefalitogeniche T nei topi EAE e il blocco di questa via induce apoptosi soprattutto nelle cellule memoria rispetto alle cellule naive. Questi dati rispecchiano le precedenti osservazioni che CD28 protegge dall'apoptosi preferenzialmente le cellule naive rispetto alle cellule memoria, suggerendo che invece ICOS abbia proprio un ruolo sulla sopravvivenza delle cellule memoria (185).

Nei tessuti che mancano delle molecole B7.1/2, il segnale mediato da ICOS potrebbe avere un ruolo decisivo, come recentemente dimostrato nel caso delle miopatie infiammatorie (186). Nella sclerosi multipla, la locale (ri)attivazione delle cellule T autoreattive nel SNC da parte delle cellule che esprimono i complessi MHC II-antigene è un evento fondamentale nell'indurre il danno autoimmune contro la guaina mielinica (187). Quanto detto assume particolare importanza se si pensa che le cellule T autoreattive nei pazienti con sclerosi multipla dipendono meno dalla costimolazione di CD28 rispetto alle cellule T dei soggetti sani (188) e inoltre che nei pazienti con sclerosi multipla esistono cellule T reattive alla mielina che sono CD4+ e CD28- e che sono (ri)attivate perifericamente o nel SNC in assenza delle molecole B7.1/2 (189).

SCOPO DEL LAVORO

Valutare il ruolo di OPN ed ICOS come potenziali marcatori genetici coinvolti nell'induzione e nel decorso clinico della Sclerosi Multipla

MATERIALI E METODI (A)

A. PAZIENTI

Abbiamo analizzato il DNA genomico di 425 pazienti (158 maschi, 267 femmine, M/F 0.59) con Sclerosi Multipla e di 688 controlli sani non imparentati tra loro e con i pazienti. La diagnosi di SM è stata effettuata seguendo i criteri di McDonald et al (2001). I pazienti fanno parte del centro Sclerosi Multipla dell'Università del Piemonte Orientale di Novara (191 pazienti), del Dipartimento di Neurologia dell'Università di Bari (158 pazienti) e del Dipartimento di Neurologia dell'Università di Trieste (76 pazienti). Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono simili a quelle indicate in letteratura (tab A3). Tutti i pazienti e i controlli non sono imparentati tra loro, sono caucasici e italiani. La fase clinica dello stato di malattia è stato valutato come segue:

RR: forma caratterizzata da fasi di recidive con successive totali remissioni, con parziali e residui deficit post recidiva e mancanza di progressione tra le recidive

PP: forma caratterizzata da progressione a partire dall'esordio della malattia con occasionali fasi di plateau

SP: forma caratterizzata da un esordio RR seguito da progressione con o senza occasionali recidive, minori remissioni e plateau

In un sottogruppo di 288 pazienti (185 di Novara e 103 di Bari) inclusi in uno studio di tipo longitudinale, il grado di disabilità e di progressione della malattia è stato valutato, rispettivamente, in base al tempo impiegato per raggiungere il valore di EDSS >3 (Kurtzke Expanded Disability Status Scale) e in base al tempo impiegato per passare alla fase progressive della malattia. I pazienti SM vengono definiti affetti dalla forma benigna se dopo almeno 10 anni di malattia hanno un EDSS <3 (Hawkins and McDonnell, 1999). I pazienti

SM che evolvono ad una forma progressive entro 10 anni dall'esordio della malattia vengono definiti "a progressione rapida". I pazienti che non raggiungono tale soglia sono esclusi. Nei pazienti RR, il siero e' stato prelevato in fase di remissione. Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995). La ricerca e' stata approvata dalla commissione etica locale.

	Popolazione totale n = 425	Popolazione con follow-up n=288
Età, (anni)	41±10 ^a	40±11 ^a
Maschi/Femmine	158:267	107:181
Età d'esordio, (anni)	29±9 ^a	30±9 ^a
Durata della malattia (anni)	11±8 ^a	10±9 ^a
EDSS	3.5±2.5 ^a	3.0±2.5 ^a
Pazienti RR, n (%)	303 (71%)	199 (69%)
Pazienti SP, n (%)	89 (21%)	68 (24%)
Pazienti PP, n (%)	33 (8%)	21 (7%)

Tabella A3. Caratteristiche cliniche dei pazienti con SM.

^a Media ±SD

A. ANALISI DEL DNA

Oligo utilizzati per identificare i polimorfismi SNP3 e SNP4 di OPN: OPN-for 5'-GCCGTGAATTCCACAGCC-3' e OPN-rev 5'-GCTCTACACCACCAAATTCTTATTACATTCAAG-3'. Come conseguenza del forte linkage disequilibrium tra gli alleli dei polimorfismi in questione, la tipizzazione dei singoli individui e' stata indicata in termini di aplotipi, senza che fosse necessaria l'analisi delle famiglie. Come template per la PCR e' stato utilizzato 200 ng di DNA genomico, e il prodotto di PCR e' stato sequenziato con l'oligo OPN-for. Le sequenze sono state ottenute

utilizzando ABI PRISM\BigDyei Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) su un sequenziatore automatico (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser).

A. OPN ELISA assay

La concentrazione di OPN nel siero e' stata valutata tramite ELISA, secondo il protocollo fornito dal produttore (Calbiochem, San Diego, CA). La densita' ottica e' stata misurata a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA). Il programma I-smart e' stato impiegato per ottenere la curva di regressione.

A. RT-PCR Quantitativa

IL cDNA di OPN codificante per gli aplotipi A, -B e C e' stato ottenuto con RT-PCR a partire da soggetti omozigoti per questi aplotipi. Per introdurre il myc-TAG sono stati utilizzati i seguenti oligo: OPN/Myc-for
5'GGGGTACCATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGATGAGAATTGC
AGTGATTTGC-

3' e OPNrev come reverse oligo (indicato sopra). I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pcNEO 3.1. L'introne VI e' stato amplificato dal DNA genomico e legato ad ogni costrutto tra l'esone VI e VII. Il competitore e' stato ottenuto dal costrutto OPN myc cDNA tramite rimozione di un frammento interno di 400 bp utilizzando l' endonucleasi di restrizione AccI (New England Biolabs, Beverly, MA) seguita da una ligazione e da una PCR. Tutti i costrutti sono stati confermati mediante sequenziamento e trasfettati nella linea 293T (rene di embrione umano) impiegando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Milan, Italy). Le cellule sono state raccolte 8 ore dopo, lavate e coltivate per 40 ore in presenza e in assenza di actinomicina D (5 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Successivamente e' stato

estratto l'RNA e trascritto in cDNA a partire dalla stessa quantità di RNA per tutti i soggetti (normalizzato con amplificazione semiquantitativa della GAPDH) e usato per quantificare OPN-Myc cDNA in RT-PCR con un forward oligo disegnato nel Myc-TAG e un reverse oligo disegnato nel 3'UTR. Ogni reazione includeva 1 µl di cDNA e 1 µl di diluzioni seriali di competitore (da 0 a 10⁶ copies/ml). Il cDNA di OPN corrisponde ad una banda di circa 1000 bp, mentre il competitore di circa 600 bp. La relativa intensità delle bande è stata analizzata con BioRad QuantaOne software

A. ANALISI STATISTICA

Per gli ELISA, l'approssimazione della distribuzione normale della popolazione è stata testata usando la statistica di kurtosis e la simmetria. I risultati erano distribuiti non simmetricamente e di conseguenza presentati come valori di mediana e percentile. Il confronto dei dati di ELISA è stato ottenuto con il test non parametrico Mann-Whitney U. L'analisi della distribuzione dei genotipi è stata effettuata con il test del Chi-square. Le correlazioni tra i genotipi e tra i parametri clinici sono state analizzate con il test di Fisher. Tutti i valori di p sono a due code e il livello di significatività è $p < 0.05$

MATERIALI E METODI (B)

B. PAZIENTI

Abbiamo analizzato il Dna genomico di 441 pazienti SM (152 maschi e 289 femmine M/F:1/1.9) e di 793 controlli sani estratti a random nella popolazione. Tutti i pazienti e i controlli non sono imparentati tra loro, sono caucasici e italiani . Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono simili a quelle indicate in letteratura

Il grado di disabilita' e' stato definito in base al valore di multiple sclerosis severity score MSSS. Nei pazienti RR, i valori di MSSS si riferiscono alla fase di remissione. I dati relativi al tasso di ricadute annue nei 3 anni precedenti il trattamento sono stati collezionati in 286 pazienti (RR e SP) seguiti in nuo studio longitudinale.

Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995). La ricerca e' stata approvata dalla commisione etica locale

B. DNA E STUDI FUNZIONALI

L'amplificazione e il sequenziamento della regione 3' UTR di ICOS e' stata ottenuta con le seguenti due coppie di oligo: ICOS-1-for 5'-GCAATGGAGAGGGGAAAGC-3' and ICOS-1-rev 5'-GTTACTATAGGTTGCTGTCAGAC-3', ICOS-2-for 5'-TTGCCTATATTCTCCCTACAAG-3' e ICOS-2-rev 5'-GAGGAGCCACTTATCAAAGAG-3'. Le sequenze sono state ottenuto utilizzando ABI PRISM\BigDyei Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) su un sequenziatore automatico (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser).

Le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto (10^5 cellule/pozzetto) in presenza di anticorpo anti CD3 fatto precedentemente aderire alla piastra (OKT3 $1 \mu\text{g/ml}$).

I livelli di proliferazione sono stati valutati mediante incorporazione di [^3H]-TdR ($1 \mu\text{Ci/pozzetto}$) durante le ultime 6 ore di 3 giorni di incubazione.

La valutazione dei livelli di espressione delle molecole di membrana e' stata valutata nelle cellule CD3+ mediante tecnica citofluorimetrica al T4 utilizzando anticorpi per le molecole CD3, CD25, HLA-DR (Caltag, Burlingame, CA) e ICOS (C398.4A). I valori sono stati espressi come rapporti di MFI (MFI-R= MFI del singolo soggetto / MFI mediana degli esperimenti appartenenti allo stesso gruppo)

Le citochine sono state analizzate nei surnatanti al T2 tramite il kit Human Th1/Th2 CBA (Becton Dickinson, San Jose, CA).

B. Analisi statistica

La distribuzione dei genotipi e' stata analizzata con il chi-square o Fisher test, I dati funzionali con il Mann-Whitney U test. Il calcolo delle combinazioni aploipiche e' stato fatto con il programma Haploview 3.11 (www.hapmap.org), che calcola anche I valori di pairwise linkage disequilibrium (LD) (r^2 e Lewontin D').

RISULTATI (A)

A1. I POLIMORFISMI DEL GENE OPN/ETA-1 SONO ASSOCIATI CON LA SUSCETTIBILITA' ALLA SM

Dati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio dimostrano che i pazienti DALD, pazienti con una variante della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), presentano livelli sierici di OPN più alti dei controlli e fanno supporre che questa molecola sia coinvolta nello sviluppo della sindrome autoimmune linfoproliferativa. Lo studio del cDNA di OPN nella nostra popolazione di pazienti e di controlli italiani ha portato all'identificazione di soli 4 polimorfismi degli 11 noti in letteratura (tab. A1) (1 nell'esone VI e 10 nell'esone VII, di cui in particolare 2 nella regione codificante e 8 al 3'UTR). Successive analisi hanno dimostrato che questi 4 SNPs formano solo 3 delle 16 possibili combinazioni aplotipiche: questi 3 aplotipi sono stati per praticità denominati A, B e C. Gli alti livelli sierici di OPN sembrano essere determinati geneticamente e le frequenze dei tre aplotipi del suo gene sono significativamente diverse nei pazienti DALD e nei controlli: l'aplotipo A è più presente nei controlli e gli aplotipi B e C sono più presenti nei pazienti. Le persone che possiedono almeno un aplotipo B o C corrono il rischio di sviluppare la malattia con una frequenza di circa 8 volte maggiore rispetto agli omozigoti AA. Per di più, all'interno delle famiglie dei pazienti DALD ci sono soggetti sani portatori di almeno un aplotipo B o C che manifestano alti livelli della proteina (136).

Questi dati suggeriscono che gli aplotipi B e C sono associati agli alti livelli sierici di OPN e che a loro volta possano contribuire allo sviluppo della malattia. Questa ipotesi è avvalorata da due tipi di evidenze sperimentali.

1. Soggetti sani (sia presi a caso nella popolazione che familiari dei pazienti DALD) che hanno l'aplotipo B o C presentano livelli sierici più elevati di soggetti sani omozigoti AA, escludendo la possibilità che questo fenotipo sia solo una conseguenza della patologia.
2. Un'analisi preliminare dell'espressione dell'mRNA di OPN nei soggetti eterozigoti AC e AB ha dimostrato che gli aplotipi B e C sono circa 5 volte più espressi dell'aplotipo A.

I 4 polimorfismi del gene OPN/ETA-1 in questione sono i seguenti:

1. +282 T/C o rs 4754 in esone 6,
2. +750 C/T o rs 1126616 in esone 7,
3. +1083 A/G o rs 1126772 in 3'UTR
4. +1239 A/C o rs 9138 in 3'UTR.

Data la suddetta associazione tra i polimorfismi di OPN e la patologia DALD, ci siamo chiesti se questo fosse vero anche per la Sclerosi Multipla. Abbiamo quindi considerato 425 pazienti e 688 controlli sani, estratti dalla medesima popolazione di base.

Abbiamo sequenziato il DNA genomico di pazienti e controlli, dimostrando per entrambi i gruppi una distribuzione genotipica degli aplotipi conforme all'equilibrio di Hardy-Weinberg.

La distribuzione degli aplotipi si è dimostrata essere significativamente differente tra pazienti e controlli ($p < 0.01$). In particolare, i pazienti hanno dimostrato, rispetto ai controlli, una più bassa frequenza dell'aplotipo A (T-SNP1, C-SNP2, A-SNP3, A-SNP4; $p=0.0193$) e una più alta frequenza dell'aplotipo B (C-SNP1, T-SNP2, A-SNP3, C-SNP4; $p=0.0245$) e dell'aplotipo C (C-SNP1, T-SNP2, G-SNP3, C-SNP4). Dal momento che l'aplotipo A è più frequente nei controlli e che quindi potrebbe avere anche per la SM un ruolo protettivo, abbiamo deciso di considerare i soggetti suddivisi in AA e non-AA.

Dall'analisi dei genotipi degli aplotipi è risultato che il genotipo AA ha una frequenza piu' bassa nei pazienti rispetto ai controlli, e che gli omozigoti AA hanno un rischio 1,56 volte inferiore rispetto ai soggetti con genotipo non-AA di sviluppare la malattia (tab A2).

ATG^a	282 (T>C)	750 (C>T)	1083 (A>G)	1239 (A>C)
rs^b	4754	1126616	1126772	9138
Aplotipo				
A	T	C	A	A
B	C	T	A	C
C	C	T	G	C

Tabella A1 Rappresentazione schematica dei SNP caratterizzanti gli aplotipi A, B, e C.

^a Posizione relative al cDNA con ATG=+1

^b Numero di accesso nella banca dati NCBI SNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp&cmd=Limits>).

Genotipo	Popolazione	
	Controlli N=688	MS^a, N=425
AA ^b	352 (51)	171 (40)
Non-AA	336 (49)	254 (60)
	OR(CI) ^c = 1.56 (1.21-2)	
	<i>p</i> = 0.0004885	
AB ^d	59 (9)	48 (11)
AC	214 (31)	165 (39)
BC	14 (2)	15 (4)
CC	48 (7)	22 (5)
BB	1 (0)	4 (1)

Tabella A2 Frequenze della distribuzione dei genotipi dei SNPs di OPN AA e non-AA in due popolazioni indipendenti di 425 pazienti SM e 688 controlli sani.

^a Pazienti con Sclerosi Multipla.

^b Numero di soggetti, frequenze indicate tra parentesi.

^c Odds ratio (OR) e limiti di confidenza (CI) 95%. I valori *p* sono stati calcolati usando il test di χ^2 (correzione di Yates).

^d Distribuzione dettagliata dei genotipi non-AA.

A2. I POLIMORFISMI DEL GENE OPN SI ASSOCIANO AL DECORSO CLINICO DELLA SM

Osservato che il genotipo AA si associa ad un più basso rischio di sviluppare la SM, abbiamo indagato se il genotipo AA potesse influenzare il decorso clinico della malattia. Abbiamo quindi considerato progressione e severità della malattia su 288 pazienti, tutti pazienti direttamente seguiti dal nostro centro, al fine di garantire una omogeneità di valutazione dello stato clinico dei singoli pazienti. Come indice di progressione della malattia è stato considerato il passaggio da una forma recidivante-remittente (RR) ad una secondaria progressiva (SP), entro od oltre dieci anni dall'esordio della malattia (progressione rapida o lenta, rispettivamente); si è osservato che la progressione lenta è significativamente più frequente in pazienti con genotipo AA, rispetto ai non-AA (85% vs 62%, $p < 0.022$) (Tab. A4). Per valutare invece il possibile significato degli aplotipi nel condizionare la severità della patologia, abbiamo considerato come parametro la Scala di Disabilità Estesa (EDSS). Abbiamo confrontato i pazienti che, dopo i dieci anni dall'esordio dalla malattia, hanno un EDSS score ≤ 3.0 (forma benigna), con quelli che invece, nello stesso arco di tempo, sviluppano un EDSS score > 3.0 (forma non benigna). È risultata una maggiore frequenza di pazienti con SM benigna tra quelli con genotipo AA, rispetto a quelli con genotipo non-AA: 42% vs 20% ($p < 0.003$) (Tab. A4). La frequenza di MS benigna su tutti i pazienti considerati nel nostro studio è 29%. Questi dati ci fanno concludere che pazienti con genotipo AA hanno sintomi più lievi della malattia rispetto ai non-AA.

Outcome	Genotypes	
	AA	Non-AA
Slow progressors ^a	34 ^b (85)	41 (62)
Fast progressors ^c	6 (15)	25 (38)
	$p = 0.022^d$	
Benign MS ^a	30 (42)	21 (20)
Non benign MS ^c	42 (58)	84 (80)
	$p = 0.003$	

Tabella A4 Frequenza di distribuzione dei differenti decorsi clinici in pazienti AA e non-AA.

^a Pazienti con forma RR (progressione lenta) o EDSS \leq 3 (MS benigna) dopo 10 anni dall'esordio.

^b Numero di pazienti con quella forma di malattia; percentuali tra parentesi. Pazienti con forma RR e meno di 10 anni di follow-up (161/288) o forma PP (21/288) sono stati esclusi dall'analisi di progressione. Pazienti con EDSS \leq 3.0 e meno di 10 anni di follow-up (111/288) sono stati esclusi dall'analisi di disabilità.

^c Pazienti passati alla forma SP (progressione rapida) o con EDSS $>$ 3 (MS non benigna) entro dieci anni dall'esordio.

^d L'analisi statistica è stata condotta comparando i differenti decorsi in pazienti AA e non-AA con il test χ^2 .

A3. I PAZIENTI SM MOSTRANO LIVELLI SIERICI DI OSTEOPONTINA MAGGIORI DEI CONTROLLI

Successivamente, abbiamo cercato una possibile correlazione tra malattia, aplotipi del gene e livelli sierici di OPN. Considerando 71 pazienti e 81 controlli sani, i livelli sierici della proteina erano significativamente più alti nei pazienti SM, mentre l'espressione delle altre citochine valutate (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-6, IL-10, e TNF-alfa) non era incrementata. In entrambi i gruppi (pazienti e controlli sani) abbiamo accertato che la distribuzione dei genotipi era confrontabile con quella ritrovata nei gruppi usati per l'analisi genetica che correlava i polimorfismi con la malattia ed il decorso clinico. Il siero dei pazienti RR sul quale abbiamo eseguito gli ELISA è stato ottenuto tramite prelievo nella fase clinica di remissione.

Nei pazienti, l'elevata espressione di OPN può essere dovuta sia al background genetico sia all'attivazione del sistema immunitario. Quindi, da una parte i polimorfismi nel 3'UTR potrebbero aumentare la stabilità del mRNA di OPN, dall'altra l'attivazione del sistema immunitario può condizionare i livelli di OPN. E' stato infatti riportato che in pazienti RR, i livelli della citochina, erano più elevati nella fase di ricaduta rispetto a quella di remissione, coerentemente con un maggiore stato di attivazione del sistema immunitario e nel nostro studio i livelli sierici di OPN nel gruppo dei pazienti con forma recidivante - remittente (RR) sono maggiori rispetto a pazienti progressivi primari o progressivi secondari. Tuttavia, l'analisi dei livelli sierici di citochine interessate nella risposta Th1 o Th2, non ha mostrato differenze tra pazienti e controlli.

I pazienti dimostrano una concentrazione sierica media di 207 ng/ml (range 55-683 ng/ml), mentre i controlli sani dimostrano un valore medio di 141 ng/ml (range 45-405 ng/ml) ($p < 0.01$) (Fig. A1).

Per accertarci che i più alti livelli sierici di OPN dimostrati nei pazienti non siano semplicemente dovuti ad una più bassa frequenza del genotipo AA nel gruppo di pazienti rispetto al gruppo dei controlli, abbiamo considerato i livelli sierici dei soggetti con genotipo AA e non-AA, rispettivamente nei pazienti e nei controlli. Analizzando i due gruppi separatamente, i pazienti continuano a mostrare livelli sierici di OPN maggiori dei controlli, nonostante la differenza sia significativa solo nel caso del gruppo con genotipo AA (Fig A1). Questo indica che, fermo restando la correlazione tra livelli sierici e genotipo, i pazienti SM mostrano livelli di OPN maggiori dei controlli non solo perché presentano una maggiore frequenza di soggetti con genotipo non-AA, in quanto a parità di genotipo i pazienti mostrano comunque livelli sierici maggiori dei controlli.

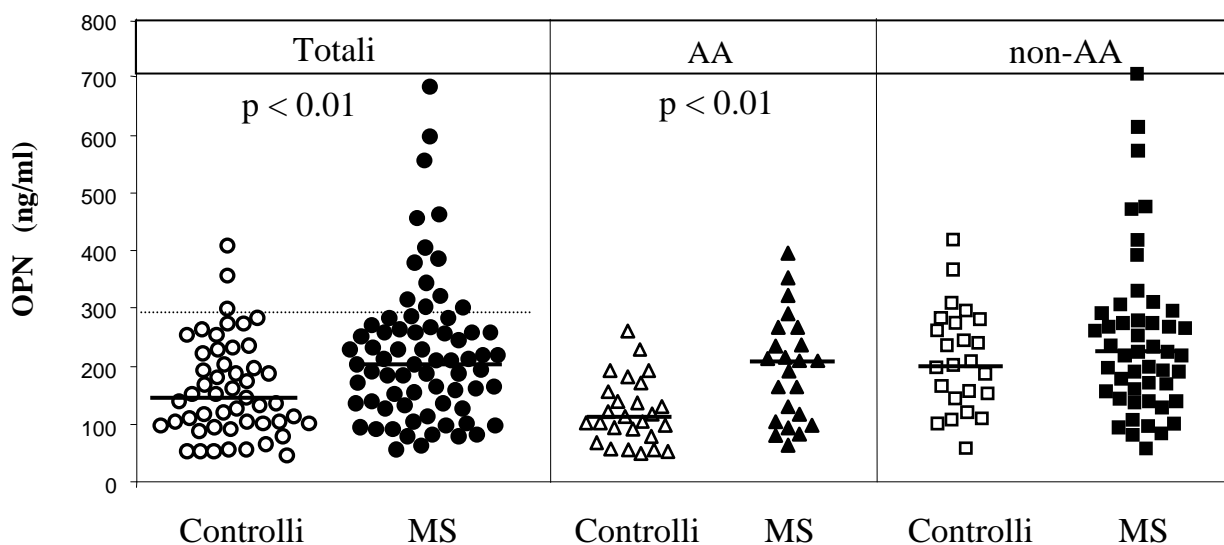


Figura A1. 1 Livelli sierici di OPN in pazienti MS e controlli sani con genotipo AA o non-AA. I livelli di OPN sono più alti nei pazienti rispetto ai controlli (pannello a sinistra) ed in pazienti AA rispetto a controlli AA (pannello centrale), mentre pazienti e controlli non-AA hanno livelli simili (pannello a destra). Le linee indicano i valori delle mediane per ogni gruppo. Il valore P è stato calcolato utilizzando il test U di Mann-Whitney.

A4. GLI APLOTIPI AL 3' UTR INFLUENZANO LA STABILITA' DEL mRNA DI OSTEOPONTINA

Abbiamo infine valutato se gli applotipi potessero influenzare il livello del mRNA di OPN. A questo scopo, il cDNA degli applotipi A, B e C di OPN è stato trasfettato transientemente in cellule 293T, ed il livello dell' mRNA è stato valutato con PCR competitiva. La strategia di clonaggio ha previsto l'aggiunta di una sequenza Myc-TAG e dell'introne VI al cDNA di partenza, questi per escludere l'amplificazione di mRNA endogeno e del plasmide, rispettivamente (Fig. A2a). Il livello di mRNA è stato analizzato prima e dopo 40h di trattamento con Actinomicina D, usata per inibire la trascrizione e valutare la stabilità del mRNA. In assenza di Actinomicina D, il livello di mRNA di OPN nelle cellule trasfettate con gli applotipi B e C, è risultato più alto rispetto a quello delle cellule trasfettate con l'aplotipo A. In presenza di Actinomicina D, il livello di mRNA di OPN nelle cellule trasfettate con l'aplotipo A non è stato rilevabile, al contrario, alti livelli di amplificato sono stati rilevati nelle trasfezioni con applotipi B e C (Fig A2b).

Questi dati suggeriscono che gli SNPs negli applotipi B e C potrebbero influenzare la stabilità dell'mRNA di OPN, ed aumentare di conseguenza la produzione della citochina.

Possiamo quindi concludere che il genotipo AA è protettivo nei confronti dello sviluppo della SM, come si era precedentemente dimostrato per la patologia DALD. Abbiamo inoltre descritto per la prima volta un'associazione tra i genotipi di OPN e la severità/progressione della SM. Possiamo pertanto affermare che i suddetti genotipi di OPN sono associati ai livelli di espressione della molecola e che questi, a loro volta, possono influenzare sviluppo e decorso della malattia.

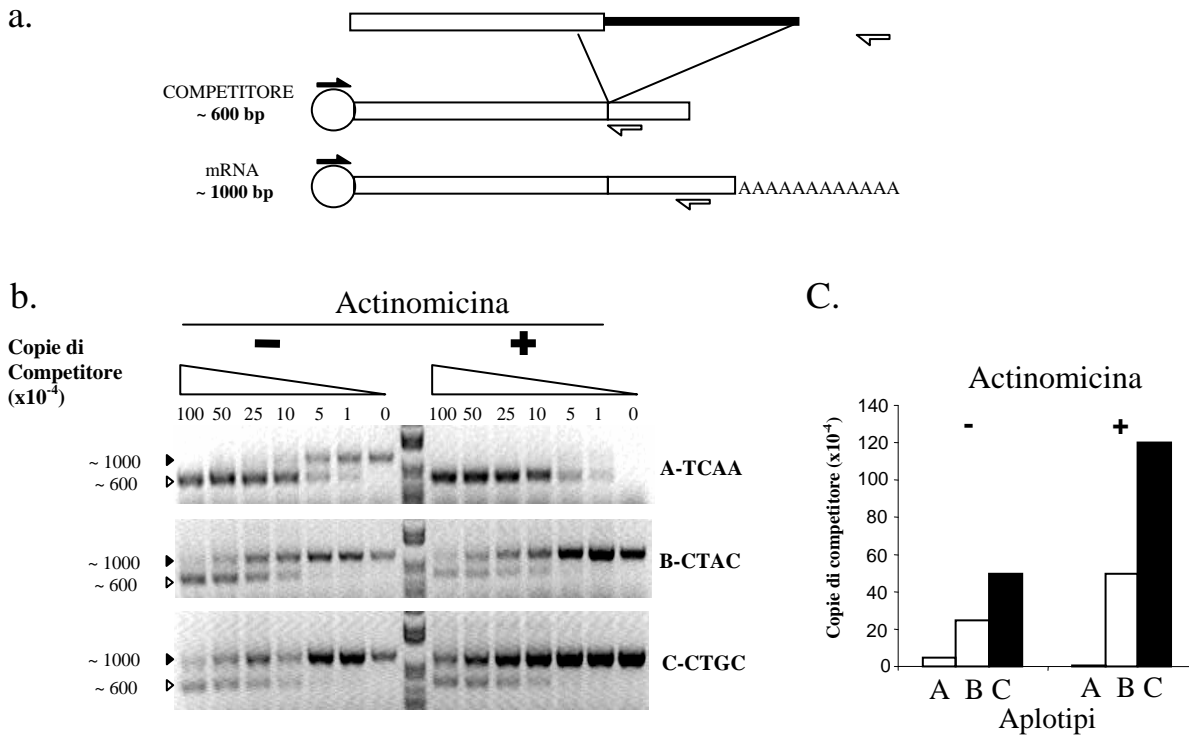


Figura A2 RT-PCR quantitativa del cDNA OPN-Myc ottenuto da 293T trasfettate con aplotipi di OPN -A, -B, o -C e coltivate in presenza o assenza di Actomicina D per 40 ore cells. (Pannello A) Schema dei vettori usati nelle trasfezioni delle cellule 293T, del competitore usato nella RT-PCR quantitativa, e dello specifico prodotto di amplificazione di OPN-myc. I rettangoli bianchi indicano la sequenza codificante, la linea nera rappresenta l'introne VI, i cerchi sono il myc-TAG. I primers sono indicati con frecce. (Pannello B) Gels dei prodotti di amplificazione ottenuti dalla RT-PCR quantitativa. Lo specifico prodotto di amplificazione del cDNA OPN-myc corrisponde alla banda di 1000-bp, mentre il competitore corrisponde alla banda di 600-bp. Ogni reazione contiene 1 μ L di cDNA OPN-myc pi \dot{u} 1 μ L di diverse diluizioni del competitore (da 0 a 10⁶ copie/ml). (Pannello C) Paragone tra il numero di copie di competitore richieste per ottenere bande equivalenti per lo specifico prodotto di amplificazione e per il prodotto relativo al competitore. Il valore mostrato per l'aplotipo-C in cellule trattate con Actinomicina D \dot{e} stato ottenuto estrapolando la curva di titolazione.

RISULTATI (B)

B1. ANALISI DELLA REGIONE 3' UTR DEL GENE ICOS

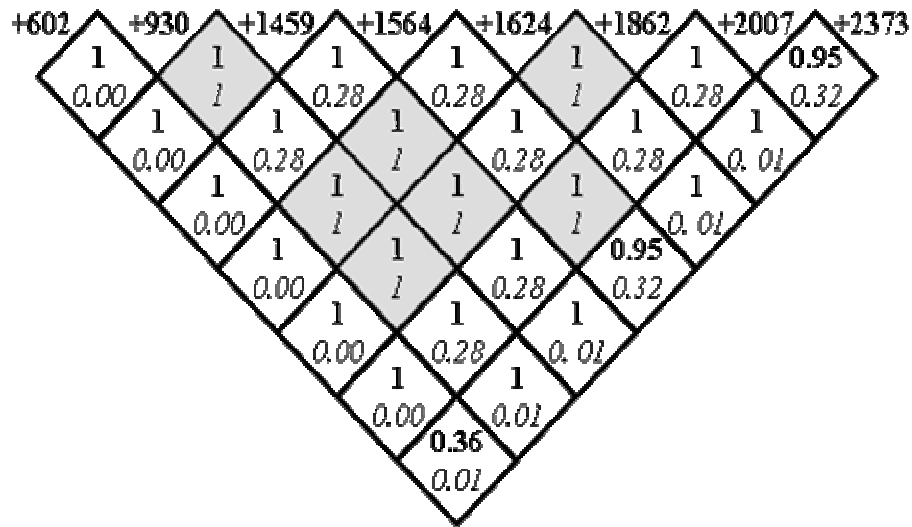
La regione genomica corrispondente al 3'UTR del gene ICOS e' stata sequenziata in 52 pazienti con Sclerosi Multipla e 87 controlli sani per individuare i polimorfismi presenti nella popolazione italiana. Questo studio pilota ha evidenziato che solo 8 dei 47 polimorfismi noti in letteratura in questa regione (<http://snpper.chip.org>) sono presenti nella nostra popolazione di pazienti e di controlli (+602 A/C, +930 G/A, +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T, +1862 A/G, +2007 G/A, +2373 G/C) *.

(*Numerazione relativa al cDNA, +1 è la prima base del codone di inizio ATG).

Questi polimorfismi hanno mostrato un forte linkage disequilibrium tra loro (fig B1a). I polimorfismi nelle seguenti posizioni, +602, +1564, +2007 sono infatti risultati in perfetto LD tra loro ($D'=1$, $r^2=0.95-1$). Data la ridondanza genetica, solo uno dei suddetti SNPs, per la precisione il +1564 T/C, e' stato considerato nelle successive analisi. Quanto appena detto vale anche per i seguenti altri SNPs +930, +1459, +1624, +1862 ($D'=1$, $r^2=1$), e di conseguenza solo uno e' stato successivamente considerato, per la precisione il +1459 A/T.

L'analisi statistica-informatica ha evidenziato 3 principali aplotipi (A, B e C) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche (fig. B1b). Dato il forte LD, questi 3 SNPs (+1459, + 1564, +2373) sono di per se sufficienti per identificare i 3 aplotipi suddetti. La frequenza allelica e genotipica di questi 3 SNPs, che a loro volta individuano le 3 combinazioni aplotipiche, e' stata valutata nei pazienti e nei controlli. (tab. B1). La frequenza dell'allele +1564 T (aplotipo A) e' risultata essere maggiore nel gruppo dei controlli rispetto a quello dei pazienti, mentre i SNPs +1459 T e +2373 C, che a loro volta individuano gli aplotipi B e C

rispettivamente, sono risultati avere una frequenza maggiore nei pazienti. Le suddette differenze non raggiungono la significativita' statistica dato il ridotto numero dei soggetti coinvolti nello studio.



Haplotype	+602	+930	+1459	+1564	+1624	+1862	+2007	+2373
A	A	G	A	T	C	A	G	G
B	C	G	A	C	C	A	A	C
C	C	A	T	C	T	G	A	G

Figura B1. Linkage disequilibrium nella regione 3'UTR di ICOS.

A: I valori di D' (Lewontin D value) e r^2 sono riportati nei singoli quadrati, I neretto e corsivo, rispettivamente. Tutti i valori si riferiscono all'allele che mostra la frequenza maggiorer nei controlli rispetto ai pazienti SM. I quadrati in grigio sono quelli con un valore di LD significativo ($p < 0.05$).

B: combinazioni aplotipiche nei pazienti e controlli.

SNP			MS (N=52) ^a	Controls (N=87) ^a
			% ^b	% ^b
1459	Alleles	A	88	93
		T	12	7
	Genotypes	AA	79	86
		AT	19	13
		TT	2	1
1564	Alleles	T	69	76
		C	31	24
	Genotypes	TT	52	61
		TC	35	33
		CC	13	8
2373	Alleles	G	80	84
		C	20	16
	Genotypes	GG	67	73
		GC	25	21
		CC	8	6

Tabella B1. distribuzione allelica e genotipica dei SNPs +1459, +1564, +2373

a :numero di soggetti sequenziati per tutti gli 8 SNPs

b: frequenze %

B2. IL GENOTIPO AA CORRELA CON I LIVELLI DI ESPRESSIONE DI ICOS E DI IL10

L'analisi degli aplotipi indica che, dei due aplotipi più frequenti nei pazienti (B e C), quello che presenta le maggiori differenze con l'aplotipo più frequente nei controlli (A), è il C. Infatti, gli aplotipi A e C condividono solo un SNP (+2373 G), mentre il B ne condivide 4 con l'aplotipo A (+930 G, +1459 A, +1624 G, +1862A) e 3 con l'aplotipo C (+602 C, +1564 C, +2007 A). Per capire se questi aplotipi influenzano i livelli di attivazione cellulare dei linfociti T, abbiamo analizzato le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) attivati con anticorpi anti-CD3 di controlli sani omozigoti per l'aplotipo A (vale a dire +1459 AA, +1564 TT, +2373 GG) e di controlli sani portatori di almeno un aplotipo C (+1459 T, +1564 C, +2373 G). Dal momento che i soggetti con genotipo CC sono estremamente rari, abbiamo scelto di analizzare i soggetti eterozigoti AC (+1459 AT, +1564 TC, +2373 GG). L'analisi è stata incentrata sui livelli di espressione di ICOS e sulla conseguente induzione delle citochine IL10 e IFN γ , note per essere modulate da ICOS stesso. È stata inoltre valutata l'espressione di CD25, HLA-DR, e la secrezione di IL2, IL4, IL5, TNF α per avere una visione globale del livello di attivazione dei linfociti T nelle due popolazioni. I PBMC di 24 soggetti sani (12 omozigoti AA e 12 eterozigoti AC) sono stati attivati con anti-CD3 e analizzati al giorno T2 e T4 dall'attivazione. I risultati hanno mostrato che i linfociti T dei soggetti omozigoti AA esprimono livelli di ICOS inferiori e livelli di IL10 superiori rispetto ai soggetti eterozigoti AC ($p < 0.05$, Mann Whitney test). Al contrario, nessuna differenza è stata riscontrata per i livelli di proliferazione, di espressione di CD25 e di HLA-DR e di secrezione delle altre citochine (fig. B2).

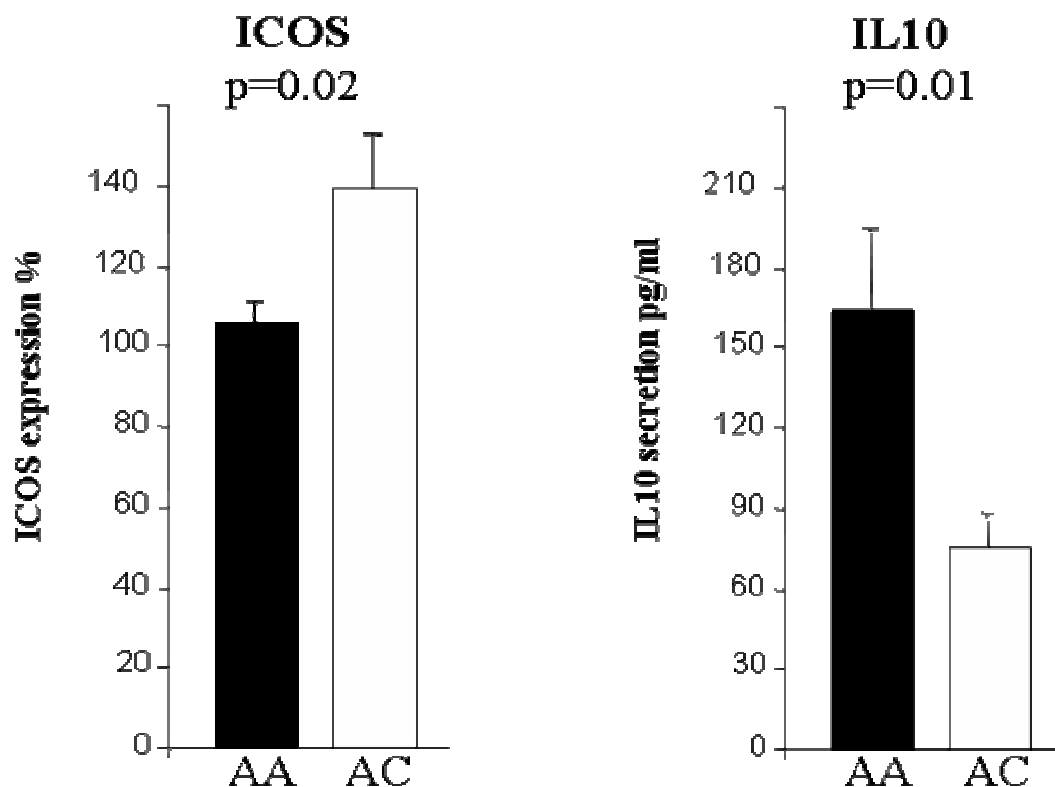


Figura B2. Livelli di espressione di ICOS e di secrezione di IL10 in linfociti T attivati in controlli sani con genotipo AA e AC. PBMC attivati con anti-CD3 mAb (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La secrezione di IL10 e' stata valutata al T2 (sinistra), l'espressione di ICOS al T4 (destra). I risultati sono espressi come la media+DS di 3 differenti esperimenti, in ognuno dei quali sono stati analizzati 4 omozigoti AA e 4 eterozigoti AC (totale dei soggetti analizzati 12 AA e 12 AC). I livelli di espressione di ICOS sono stati calcolati nel seguente modo: (media del singolo soggetto / media dei 4 omozigoti AA appartenenti allo stesso esperimento) X 100; 100% indica la media degli omozigoti AA. L'analisi statistica e' stata effettuata con Mann-Whitney U test.

B3. L'OMOZIGOSI PER L'APLOTIPO "A" CORRELA CON LA SUSCETTIBILITA' ALLA SM E CON LA GRAVITA' DELLA MALATTIA

Dal momento che e' stata riscontrata un'associazione funzionale tra l'omozigosi per l'aplotipo A e i livelli di espressione di ICOS e della citochina anti infiammatoria IL10, e che lo studio pilota condotto inizialmente ha suggerito che la frequenza dell'omozigosi per l'aplotipo A potrebbe essere inferiore nei controlli rispetto ai pazienti, abbiamo valutato la frequenza degli omozigoti AA in 441 pazienti SM e 793 controlli sani sequenziando i polimorfismi alle seguenti posizioni +1459, +1564, +1624. La tab. B2 mostra che il genotipo AA ha una frequenza piu' bassa nei pazienti rispetto ai controlli, e che gli omozigoti AA hanno un rischio 1,33 volte inferiore rispetto ai soggetti con genotipo non-AA di sviluppare la malattia ($p= 0.019$, $OR= 1.33$). I suddetti dati suggeriscono che l'aplotipo A potrebbe agire come fattore recessivo protettivo nei confronti della SM, mentre gli aplotipi B e C potrebbero giocare un ruolo predisponente.

Data la vicina localizzazione di ICOS al gene CTLA4 e data la nota associazione dei SNPs di CTLA4 al promotore (-318 C/T) e all esone 1 (+49 A/G) con note malattie autoimmuni quali T1DM, tiroiditi, LES e SM, e' possibile che la suddetta associazione dell'aplotipo A con la SM sia in realta' una conseguenza del suo LD con questi SNPs. Inoltre, recentemente e' stato pubblicato un lavoro che associa il polimorfismo -1413 G/A al promotore di ICOS con la produzione di citochine di tipo Th2 e con l'allergia IgE mediata. Per escludere che i polimorfismi da noi studiati fossero in realta' in LD con quelli di CTLA4 e con quello al promotore di ICOS, ne abbiamo valutata la frequenza in 49 pazienti e 54 controlli e il valore di D' di r^2 con i SNPs +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T. Nessuno dei 3 polimorfismi della regione 3' UTR di ICOS ha mostrato un significativo LD con i SNPs di CTLA4 e del promotore di ICOS (dati non mostrati).

Per valutare se questi aplotipi avessero un ruolo nel condizionare la severita' della malattia, abbiamo paragonato le condizioni cliniche dei pazienti con diverso genotipo, in particolare tra omozigoti AA e non AA. Eta' e sesso non differivano tra i due gruppi. L'analisi ha mostrato che i pazienti con genotipo AA mostrano una maggiore frequenza di Primari Progressivi (PP) (8.4% vs 2.5%, p=0.0068) (tab. B3). Inoltre, se si considerano solo i pazienti Remissivi Remittenti (RR), i pazienti con genotipo AA mostrano un tasso di ricadute annuali inferiore rispetto ai pazienti con genotipo non AA (mediana annua 0.7 vs 1.4, p 0.0001) (tab. B4). Infine, sempre nel gruppo dei pazienti RR, quelli con genotipo AA mostrano un decorso clinico migliore rispetto ai pazienti non AA (mediana MSSS 1.9 vs 3.7, p 0.008) (tab. B4), mentre nessuna differenza e' stata trovata considerando i pazienti PP.

Genotype	MS N=441	Controls N=793	OR^b (CI)	p^c
AA	237 ^a (53.7)	482 (60.8)	0.75 (0.59-0.96)	0.019
non-AA	204 (46.3)	311 (39.2)	1.33 (1.05-1.7)	
AB^d	117 (26.5)	187 (23.6)		
AC	59 (13.4)	73 (9.2)		
BB	17 (3.9)	32 (4)		
BC	8 (1.8)	15 (1.9)		
CC	3 (0.7)	4 (0.5)		

Tabella B2. frequenza della distribuzione dei genotipi di ICOS in 441 pazienti SM e 793 controlli.

a: numero di soggetti (frequenze in %)

b: Odds ratio (OR) e 95% di intervallo di confidenza (CI).

c: I valori di P sono stati calcolati usando χ^2 test (Yates corrected)

d: numeri e frequenze dei soggetti non AA divisi per singoli genotipi

Symptoms at onset	Genotype		
	AA N=237	Non-AA N=204	
Bout	217 ^a (91.6%)	199 (97.5%)	P=0.0068 ^b
Progressive	20 (8.4%)	5 (2.5%)	

Tabella B3. analisi del tipo di esordio nei pazienti SM con diversi genotipi di ICOS

a: numero si soggetti (frequenze in parentesi).

b: Fisher Exact test

Outcome measure	Genotype	
	AA N=158	Non-AA N=128
Relapse rate	0.7 ^a (0.3-1.2)	1.4 (0.5-2.0) ^b
MSSS	1.9 (0.6-4.8)	3.7 (1.3-6.0) ^c

Tabella B4. Outcome measures in patients with bout onset displaying different ICOS genotypes

a: median values; interquartile ranges are shown in the brackets

b: $p < 0.0001$, Mann-Withney *U* test

c: $p = 0.008$, Mann-Withney *U* test

DISCUSSIONE (A)

GENE DI OPN

Due tipi di evidenze legano OPN alla SM. Primo, polimorfismi del suo gene sono stati variabilmente associati allo sviluppo della SM. Secondo, alti livelli di OPN sono stati rilevati nelle placche e nel siero di pazienti con SM. Tuttavia, nessuno finora ha dimostrato che esista un nesso tra gli alti livelli sierici di OPN e l'aumentata suscettibilità alla SM legata al gene di OPN.

Questo lavoro prende spunto da nostri dati precedenti che hanno individuato tre nuovi aplotipi del gene di OPN e hanno individuato nell'omizigosi per l'aplotipo A (genotipo AA) un fattore protettivo per lo sviluppo della sindrome autoimmune linfoproliferativa, una rara malattia autoimmune con forte impronta ereditaria; viceversa lo stato di portatore per gli aplotipi B e C risultavano essere un potente fattore di rischio. L'analisi di questi aplotipi nei pazienti con SM ha ora dimostrato che la stessa considerazione vale anche per la SM e dimostra che questi stessi aplotipi possono agire influenzando la produzione di OPN dal momento che il genotipo protettivo AA determina la produzione di livelli della citochina inferiori a quelli associati agli aplotipi di suscettibilità B e C.

L'analisi della frequenza dei diversi genotipi nei pazienti e nei controlli ha dimostrato che la frequenza degli omozigoti AA è minore nei pazienti rispetto ai controlli e si associa ad un rischio di sviluppare la SM ridotto di 1.56 volte. Questi dati sono in sintonia con quelli di altri autori che dimostrano che l'allele C in posizione +282, presente nei nostri aplotipi B e C, è associato con la suscettibilità alla SM (181). Il fatto che altri autori non abbiano riscontrato associazioni significative di alcuni di questi polimorfismi con la SM (140, 208), potrebbe essere dovuto a differenze etniche del background genetico delle popolazioni prese in esame, legato alla esistenza di diverse combinazioni aplotipiche nello stesso gene di OPN oppure a differenze in geni diversi.

In secondo luogo, i pazienti con SM con genotipo AA sembrano sviluppare forme cliniche di malattia più lievi rispetto ai pazienti portatori degli aplotipi B e C (non-AA). La SM è molto eterogenea dal punto di vista dell'esordio e decorso clinico (254, 255, 256). Alcuni autori hanno dimostrato che fattori clinici e demografici quali sesso, età, sintomi all'esordio (254), possono influenzare lo sviluppo della malattia, ma finora ben poco è noto riguardo al ruolo prognostico di fattori genetici (257). In questo lavoro, abbiamo analizzato la clinica dei pazienti SM da due differenti prospettive considerando sia l'indice di progressione che lo sviluppo di disabilità nel tempo. Infatti, i pazienti con genotipo AA hanno mostrato avere un decorso relativamente "benigno", in quanto ben il 42% dei pazienti con questo genotipo presentano un valore di EDSS minore o uguale a 3 dopo almeno 10 anni di malattia, contro il 20% dei pazienti portatori dell'aplotipo B o C. La frequenza globale dei pazienti SM con forma benigna nel nostro studio (29%) era comparabile a quella di altre serie di pazienti pubblicate da altri autori (258). Inoltre, i pazienti con genotipo AA sembrano evolvere verso una forma progressiva secondaria più lentamente rispetto ai pazienti con genotipi non-AA. Secondo Weinshenker et al. (259), la frequenza con cui i pazienti passano da una forma RR ad una forma SP della malattia è di circa 41% entro 10 anni dall'esordio. Nella nostra popolazione di pazienti, tale frequenza è di circa il 29% sul totale dei pazienti e di circa il 15% o 38% a seconda che si tratti di pazienti con genotipo AA o non AA, rispettivamente. Questi risultati sono stati ottenuti con un'analisi retrospettiva su un numero relativamente limitato di pazienti e necessita quindi di essere riconfermata su una più ampia casistica e possibilmente con un'analisi di tipo longitudinale che valuti anche la progressione del danno tramite risonanza magnetica (260).

Gli aplotipi del gene di OPN sembrano influenzare direttamente i livelli di produzione di questa citochina. Questa possibilità è comprovata da tre ordini di dati. In primo luogo, soggetti sani omozigoti per l'aplotipo A presentano livelli sierici di OPN significativamente inferiori a quelli dei portatori degli aplotipi B o C. In secondo luogo, l'analisi del mRNA di OPN in soggetti sani eterozigoni AB oppure AC ha dimostrato che l'mRNA degli aplotipi B e C è sempre più

rappresentato di quello dell'aplotipo A. In terzo luogo, la trasfezione del cDNA corrispondente ai diversi aplotipi ha dimostrato che gli aplotipi B e C sono maggiormente espressi rispetto all'aplotipo A. Una possibilità è che l'effetto degli aplotipi sui livelli di espressione siano legati a una diversa stabilità dell'mRNA, di cui potrebbero essere responsabili i polimorfismi nell'3'UTR del gene di OPN. Infatti è stato dimostrato in altri sistemi genici che il 3'UTR può contribuire a stabilizzare l'mRNA attraverso il legame a specifiche proteine regolatrici. Questa azione sarebbe dovuta preferenzialmente, ma non esclusivamente, a regioni ricche in adenina e uracile (261, 262). Poiché però queste regioni sono assenti nel 3'UTR di OPN, bisogna supporre l'intervento di altri "motivi" non ancora noti. D'altra parte i nostri dati non permettono di escludere che l'effetto degli aplotipi di OPN possa anche essere legato a altri polimorfismi, non analizzati in questo studio, situati ad esempio nel promotore di OPN.

Questi dati suggeriscono che gli aumentati livelli di OPN presenti nei pazienti con SM siano almeno in parte dovuti alla aumentata frequenza degli aplotipi B e C, che favoriscono la produzione di elevati livelli della citochina. D'altra parte, questo modello non spiega appieno i risultati ottenuti con i dosaggi sierici di OPN, in quanto i pazienti con genotipo AA hanno mostrato livelli di OPN significativamente superiori rispetto ai controlli con lo stesso genotipo. Questo suggerisce che, almeno in questo gruppo di pazienti, gli aumentati livelli di OPN possono anche essere legati a uno stato di attivazione immunitaria, che potrebbe essere particolarmente evidente in questi soggetti che hanno normalmente bassi livelli basali della citochina. In linea con un effetto dello stato di attivazione immunitaria, i livelli sierici di OPN sono più alti in fase di ricaduta rispetto a quella di remissione nei pazienti RR (138, 265) e secondo dati forniti da uno studio longitudinale i livelli di OPN aumenterebbero appena prima dell'aggravarsi della malattia (266).

Per concludere, questo è il primo lavoro in cui genotipi del gene di OPN vengono associati non solo a suscettibilità e gravità della SM, ma anche ai livelli di questa citochina. L'effetto predisponente degli alti livelli di OPN può dipendere dall'azione proinfiammatoria di questa citochina che si può spiegare direttamente a livello di macrofagi oppure indirettamente, attraverso l'effetto favorente la

differenziazione dei linfociti T helper di tipo 1 proinfiammatori. Inoltre, una volta indotta la reazione autoimmune, l'attivazione di una risposta immunitaria potrebbe aumentare ulteriormente i livelli di OPN aggravando ulteriormente il quadro infiammatorio specie a livello delle lesioni nel SNC (137).

DISCUSSIONE (B)

GENE DI ICOS

La molecola ICOS è stata legata all'insorgenza di SM prevalentemente sulla base di dati sul modello animale della EAE e in particolare sulla base dell'osservazione che il topo knockout per ICOS presenta un'aumentata suscettibilità alla EAE e che il trattamento di topi con EAE con molecole bloccanti ICOS modifica il decorso della malattia.

Il lavoro descritto in questa tesi evidenzia come nell'uomo un aplotipo formato da SNPs del gene di ICOS nella regione 3'UTR influenzi da un lato l'espressione di ICOS e la risposta T linfocitaria, e dall'altro la suscettibilità alla SM e il suo decorso clinico.

In primo luogo l'omozigosi per l'aplotipo A del gene di ICOS sembra proteggere dalla forma RR della malattia dal momento che la frequenza di questo genotipo è inferiore nei pazienti rispetto ai controlli e conferisce un OR di 1,33 (ovvero i soggetti con genotipo AA hanno un rischio di sviluppare la malattia 1,33 volte inferiore rispetto ai soggetti con genotipo non-AA). Il fatto che nessuna associazione sia stata trovata con le forme PP della malattia può essere legato al numero estremamente limitato di casi PP analizzato, oppure a un diverso ruolo di ICOS in queste due forme di malattia. E' degno di nota che un precedente lavoro condotto su un gruppo Norvegese non ha evidenziato nessuna associazione di vari SNPs di ICOS con la SM, ma senza analizzare la regione 3'UTR, che era invece oggetto dell'analisi effettuata in questa tesi. L'interesse degli aplotipi da noi individuati è invece confermato dal lavoro di Haimila et al., i quali hanno dimostrato l'associazione col morbo celiaco di un aplotipo del gene di ICOS formato dagli SNP +173T-602C-930A-1459T-1564C-1624T-1862G-2373G, che condivide 7 SNPs con il nostro aplotipo C e solo 1 SNP con l'aplotipo A.

In secondo luogo, l'omozigosi per l'aplotipo A sembra anche influenzare l'evoluzione clinica della malattia in quanto i pazienti con genotipo AA mostrano un decorso clinico più favorevole dei portatori degli aplotipi B e C, in quanto presentano meno ricadute annuali e un valore di MSSS inferiore rispetto ai pazienti RR con genotipo non AA.

Infine, l'omozigosi AA sembra influenzare l'espressione di ICOS sulla membrana dei linfociti T, come indicato dai dati che dimostrano che i soggetti sani omozigoti AA esprimono livelli inferiori di ICOS rispetto ai soggetti eterozigoti AC e producono maggiori livelli di IL10. Questa azione sembra relativamente specifica poiché la proliferazione linfocitaria, l'espressione di altri marcatori di attivazione quali CD25 e HLA-DR, e la secrezione di altre citochine quali IL2, IL4, IL5, IFN γ e TNF α non sembrano diverse nei soggetti con genotipo AA e non-AA. Come già visto per il gene di OPN questo effetto sull'espressione di ICOS potrebbe essere direttamente imputabile alla localizzazione nel 3'UTR degli SNPs, dal momento che questa regione può influenzare la stabilità del mRNA. Il perfetto LD osservato tra i SNPs +602, +1564 e +2007, non consente di discernere quale di questi 3 SNPs sia realmente importante nel determinare l'effetto osservato.

Il fatto che gli inferiori livelli di ICOS dei soggetti con genotipo AA possano favorire la secrezione di IL10 non è del tutto sorprendente dal momento che nell'uomo l'espressione di ICOS sembra maggiore nei linfociti Th1, rispetto ai linfociti Th2, produttori di IL10.

Nell'insieme, i dati suggeriscono quindi che l'omozigosi AA possa proteggere dallo sviluppo della SM favorirne un'evoluzione clinicamente meno severa attraverso una riduzione dei livelli di ICOS e un conseguente aumento dei livelli di IL-10, che è una citochina antinfiammatoria secreta dalla sottopopolazione Th2 e dai linfociti T regolatori. In linea con questo modello è noto che IL-10 inibisce sia la differenziazione in Th1 dei linfociti sia l'attivazione macrofagica, entrambi eventi cruciali nelle placche di demielinizzazione, ed è importante nel mediare la remissione di malattia nella EAE.

BIBLIOGRAFIA

1. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; 85: 299-302
2. Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG. The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1997; 72(9): 871-878
3. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001; 22(2): 117-139
4. Sotgiu S, Pugliatti M, Sanna A, Sotgiu A, Castiglia P, Solinas G, Dolei A, Serra C, Bonetti B, Rosati G. Multiple sclerosis complexity in selected populations: the challenge of Sardinia, insular Italy. *Eur J Neurol* 2002; 9(4): 329-341
5. Dean G, and Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 1971; 3: 725-729
6. Alter M, Leibowitz U, and Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol* 1966; 15: 234-237
7. Kurtzke JF. SM epidemiology worldwide. One view of current status. *Acta. Neurol. Scand Suppl* 1995; 161: 23-33
8. Weinshenker, B.G., 1995. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol. Clin.* 472. 13, 119–146.
9. Ebers GC, Dymnt DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998; 18(3): 295-299
10. Tienari PJ, Wikstrom J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992; 340(8826): 987-991
11. Ebers GC, Sadovnick AD, and Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995; 377: 50-51

12. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994 44(1): 11-15
13. Johnson R, Gibbs C. Koch' s postulates and slow infestions of the nervous system. *Arch Neorol* 1974; 30: 36-38
14. Kurzke JF, Gudmundsson K, Bergmann S. Multiple sclerosis in Iceland . I. Evidence of a postwar epidemic. *Neurology* 1982; 32: 143-150
15. Wolinsky JS. Progressive rubella panencephalitis. In: McKendall RR (ed.), *Viral Disease. Handbook of Clinical Neurology, New Series*, Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL (series eds.). Chapter 25, 1988; 56: 401-416
16. Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M, et al. Human herpes virus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 1998; 4: 490-496
17. Nielsen L, Larsen AM, Munk M, Vestergaard BF. Human herpes virus-6 immunoglobulin G antibodies in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1997; (suppl) 169: 76-78
18. Soldan SS, Berti R, Salem N, et al. Association of human herpes virus-6 (HHV-6) with multiple sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997; 3: 1394-1399
19. Berti R, Soldan SS, Akhyani N, McFarland HF, Jacobson S. Extended observations on the associations of HHV-6 and multiple sclerosis. *J Neurovirol* 2000; (suppl 2): S85-S87
20. Ongradi J, Rajda C, Mordi C, et al. A pilot study on the antibodies to HHV-6 variants and HHV-7 in CSF of SM patients. *J Neurovirol* 1999; 5: 529-532
21. Friedland JE, Lyons MJ, Cu G, et al. The association of the human herpes virus-6 and SM. *Mult Scler* 1999; 5: 355- 362
22. Enbom M, Wang FZ, Fredrikson S, et al. Similar humoral and cellular immunologica reactivities to human herpes virus-6 in patients with multiple sclerosis and controls. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 545-549

23. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, et al. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpes viruses in multiple sclerosis: A population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 539-542
24. Herman MA, Zhang SM, Lipworth L, Olek MJ, Ascherio A. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 2001; 12: 301-306
25. Bech E, Lycke J, Gadenberg P, et al. A randomized, double blind, placebo controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in SM. *Neurology* 2002; 58: 31-36
26. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, et al. Detection of virion-associated SMRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 351: 33
27. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, et al. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 2001; 22: 171-173
28. Johnston JB, Silva C, Holden J, et al. Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implication for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* 2001; 50: 429-430
29. Fryden A, Kihlstrom E, Mallet R. A clinical and epidemiologic study of ornithosis caused by *C. pneumoniae* and *C. psittaci*. *Scand J Infect* 1989; 21: 681-691
30. Sundelof B, Gnarpe H, Gnarpe J. An unusual manifestation of *C. pneumoniae* meningitidis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 259-261
31. Socan M, Beovic B, Kesse D. *C. pneumoniae* associated meningoencephalitis. *N Engl J Med* 1994; 331: 406
32. Koskiniemi M, et al. *C. Pneumoniae* associated with CNS infections. *Eur J Neurol* 1996; 36: 160-163
33. Guigleminotti J, Lellouche N, Maury E. Severe meningoencephalitis an unusual manifestation of *C. pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30 : 209-210
34. Haidl S, et al. Guillain-Barré syndrome after *C. Pneumoniae* infection. *N Engl J Med* 1992; 326: 576-577

35. Michel D, Antoine JC, Pozzetto B. Lumbosacral radiculopathy associated with *C. pneumoniae* infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 511
36. Korman TM, Turnidge JD, Grayston ML. Neurologic complications of chlamydial infections: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 847-851
37. Heick A. *C. pneumoniae* associated ADEM. *Eur J Neurol* 2000; 7: 435-438
38. Airas L, et al. Encephalitis associated with *C. pneumoniae*. *Neurology* 2001 ; 56 (12): 1778-1779
39. Balin BJ, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1998; 187: 23-42
40. Sriram S, Mitchell W, Stratton C. Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the SNC. *Neurology* 1998; 50: 571-572
41. Kaufman M, et al. Is *C. pneumoniae* found in spinal fluid of SM patients? *Mult Scler* 2002; 8: 289-294
42. Gieffers J, et al. Presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in the cerebral spinal fluid is a common phenomenon in a variety of neurological disease and not restricted to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 49(5): 585-589
43. Ikejima H, et al. PCR- based method for isolation and detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8(3): 499-502
44. Kosma P. Chlamidial LPS- a review. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 385-402
45. Scolding NJ, Zajicek JP. Compston DAS The pathogenesis of demyelinating disease. *Prog Neurobiol* 1994; 43: 143-173
46. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 1992,14(3): 821-822
47. Kida S, Pantazis A, Weller RO. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunologic significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993: 19: 480-488

48. Weller RO, Kida S, Zhang ET. Pathways of fluid drainage from the brain. Morphological aspects and immunologic significance in rat and men. *Brain Pathol* 1992; 2: 277-284
49. Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM. Drainage of extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunologic significance. *Brain Pathol* 1992; 2: 269-276
50. Knopf PM, Cserr HF, Nolan SC, Wu TY, Harling-Berg CJ. Physiology and immunology of lymphatic drainage of interstitial and cerebrospinal fluid from the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 175-180
51. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 1994; 107: 1347-1357
52. Sharief MK, Ciardi M, Thompson EJ. Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor- α but not interleukin-1 β . *Infect Dis* 1992; 166: 350-358
53. Yang GY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Lorrin Betz A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 69: 135-143
54. de Vries HE, Blom-Rosemalen MC, van Oosten M, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Immunol* 1996; 64: 37-43
55. Gloor SM, Weber A, Adachi N, Frei K. Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 804-809
56. Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991; 1: 97-105
57. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991; 28: 254-260

58. Ludowyk PA, Willenborg DO, Parish CR. Selective localisation of neuron-specific Y lymphocytes in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1992; 37: 237-250
59. Wekerle H, Engelhardt B, Risau W, Meyermann R. Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro. *Brain Pathol* 1991; 1: 107-114
60. Seabrook TJ, Johnston M, Hay JB. Cerebral spinal fluid lymphocytes are part of the normal recirculating lymphocyte pool. *J Neuroimmunol* 1991; 91: 100-107
61. Mobley J, Evans G, Dailey MO, Perlman S. Immune response to a murine coronavirus: identification of a homing receptor-negative CD4⁺ T-cell subset that responds to viral glycoproteins. *Virology* 1992; 187: 443-452
62. Mobley JL, Rigby SM, Daily MO. Regulation of adhesion molecule expression by CD8 T-cells in vivo. II. Expression of L-selectin (CD62L) by memory cytolytic T-cells responding to minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 1994; 153: 5443-5452
63. Racke MK, Ratts RB, Arredondo L, Perrin PJ, Lovett-Racke A. The role of costimulation in autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol* 2000; 107(2): 205-15
64. Jemison LM, Williams SK, Lublin FD, Knobler RL, Korngold R. Interferon-gamma-inducible endothelial cell class II major histocompatibility complex expression correlates with strain- and site-specific susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 15-22
65. Prat A, Biernacki K, Becher B, Antel JP. B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 129-136
66. Dittel BN, Visintin I, Merchant RM, Janeway CA Jr. Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999; 163: 32-39
67. Fisher HG, Bielinsky AK. Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int Immunol* 1999; 11: 1265-1274

68. Fisher HG, Bonifas U, Reichmann G. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000; 164: 4826-4834
69. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; 80(5): 707-718
70. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, Hafler DA. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995; 182(6): 1985-1989
71. Achim CL, Morey MK, Wiley CA. Expression of major histocompatibility complex and HIV antigens within the brain of AIDS patients. *AIDS* 1991; 5: 535-541
72. Achim CL, Wiley CA. Expression of major histocompatibility complex antigens in the brains of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 257-263
73. Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 1993; 7: 75-83
74. Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA, et al. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 1986; 136: 3239-3245
75. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, et al. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993; 7: 84-92
76. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 1992; 14(3): 821-822
77. Lynch DH, RaSMdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunology Today* 1995, Vol.16 No.12
78. Nagata S and Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995, Vol.267

79. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, DiFranco D, Priori R, Conti F, Dianzani I, Valesini G, Merletti F, Dianzani U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood* 2000; 95(10): 3176-3182
80. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000; 288(5475): 2354-2357
81. Saas P, Boucraut J, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, Desplat-Jego S, Bernard D, Walker PR, Dietrich PY. CD95 (Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: a key role in brain inflammation? *J Immunol* 1999; 162(4): 2326-2333
82. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996; 184(6): 2361-2370
83. Waldner H, Sobel RA, Howard E, Kuchroo VK. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1997; 159(7): 3100-3103
84. Zipp F, Weller M, Calabresi PA, Frank JA, Bash CN, Dichgans J, McFarland HF, Martin R. Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 43(1): 116-120
85. Malipiero U, Frei K, Spanaus KS, Agresti C, Lassmann H, Hahne M, Tschopp J, Eugster HP, Fontana A. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient *lpr* and *gld* mice. *Eur J Immunol* 1997; 27(12):3151-3160
86. Huang W, Huang P, Gomes A, Hillert J. Apoptosis mediators FasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in SM. *Neurology* 2000; 55: 928-34

87. Macchi B, Matteucci C, Nocentini U, Tacconi S, Pagnini V, Mastino A, Caltagirone C. Defective Fas ligand production in lymphocytes from SM patients. *Neuroreport* 2001; 12: 4113-4116
88. Cannella B, Raine C. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 37: 424-435
89. Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumoral necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patient with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; 38: 27-33
90. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Poser S. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patient with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44: 1523-1526
91. Khoury SJ, Orav EJ, Guttmann CR, Kikinis R, Jolesz FA, Weiner HL. Changes in serum levels of ICAM and TNF-R correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 53: 758-764
92. Makhoulouf K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in SM. *J Neuroimmunol* 2001; 119(1): 145-149
93. van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, et al. Decreased interleukin-10 and interleukin-12 p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45: 695-703
94. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Poser S. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patient with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44: 1523-1526
95. van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, et al. Decreased interleukin-10 and interleukin-12 p40 mRNA are associated with disease

- activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45: 695-703
96. Van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45(6): 695-703
 97. Smith DR, Balashov KE, Hafler DA, Khoury SJ, Weiner HL. Immune deviation following pulse cyclophosphamide/methylprednisolone treatment of multiple sclerosis: increased interleukin-4 production and associated eosinophilia. *Ann Neurol* 1997; 42: 313-318
 98. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 318-323
 99. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987; 1: 893-895
 100. Balashov KE, Olek MJ, Smith DR, Khoury SJ, Weiner HL.: Seasonal variation of interferon-gamma production in progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 44: 824-828
 101. Jiang H, Milo R, Swoveland P, et al. Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol* 1995; 61: 17-25
 102. Kaser A, Deisenhammer F, Berger T, Tilg H. Interferon beta-1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. *Lancet* 1999; 353: 1414-1414

103. Becher B, Giacomini PS, Pelletier D, et al. Interferon-gamma secretion by peripheral blood t-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Ann Neurol* 1999; 45: 247-250
104. Bakhiet M, Ozenci V, Withagen C, et al. A new cell enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates gamma interferon suppression by beta interferon in multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 415-419
105. Rep MH, Schrijver HM, van Lopik T, et al. Interferon(IFN)-beta treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T-cells in SM patients. *J Neuroimmunol* 1999; 96: 92-100
106. Gayo A, Mozo L, Suarez A, et al. Interfero beta-1b treatment modulates TNF alpha and IFN-gamma spontaneous gene expression in SM. *Neurology* 1999; 52: 1764-1770
107. Ossege LM, Sindern E, Voss B, Malin JP. Immunomodulatory effects of IFN-beta-1b on the mRNA-expression of TGF-beta 1 and TGF-alpha in vitro. *Immunopharmacology* 1999; 43: 39-46
108. Wang X, Chen M, Wandinger KP, WilliaSM G, Dhib-Jalbut S. Interferon-beta inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10 dependent mechanism: relevance to interferon-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 2000; 165: 548-557
109. Ossege LM, Sindern E, Patzold T, Malin JP. Immunomodulatory effects of interferon-beta-1b in vivo: induction of the expression of transforming growth factor-beta 1 and its receptor type II. *J Neuroimmunol* 1998; 91: 73-81
110. Perini P, Tiberio M, Sivieri S, et al. Interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type I and II, and soluble E-selectin serum levels in multiple sclerosis patients receiving weekly intramuscular injections of iterferon-beta 1a. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 81-86

111. Petinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein : requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 1981 ; 127(4) : 1420-1423
112. Panitch HS, McFarlin DE. Experimental allergic encephalomyelitis: enhancement of cell-mediated transfer by concanavalin A. *J Immunol* 1977 ; 119(3) : 1134-1137
113. Bernard CC, Leydon J, Mackay IR. T-cell necessity in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in mice. *Eur J Immunol* 1976; 6(9): 655-670
114. Karpus WJ, Ransohoff RM. Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis : temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *J Immunol* 1998 ; 161(6) : 2667-2671
115. Matejuk A, Vandenbark AA, Burrows GG, Bebo BF Jr, Offner H. Reduced chemokine and chemokine receptor expression in spinal cords of TCR BV8S2 transgenic mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis with BV8S2 protein. *J Immunol* 2000 ; 164(7) : 3924-3931
116. Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, et al. CD28-B7 costimulatory blockade by Ctl4Ig prevents actively induced experimental allergic encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 1995; 155: 4521-4524
117. Patarca R, Wei FY, Singh P, Morasso MI, Cantor H. Dysregulated expression of the T cell cytokine Eta-1 in CD4-8- lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *J Exp Med.* 1990;172:1177-1183
118. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today.* 2000;21:475-478.
119. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000;287:860-864.

120. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061.
121. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998 Feb;152(2):353-8.
122. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol.* 1999 Mar-Apr;7(2):103-13. Review
123. Tian JY, Sorensen ES, Butler WT, Lopez CA, Sy MS, Desai NK, Denhardt DT. Regulation of no synthesis induced by inflammatory mediators in RAW264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin.
124. Scott JA, Weir ML, Wilson SM, Xuan JW, Chambers AF, McCormack DG. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):H2258-65.
125. Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, Tominaga S, Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW264.7 cells. *UBMB Life.* 2000 Mar;49(3):217-21.
126. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000;287:860-864.
127. Patarca R, Wei FY, Singh P, Morasso MI, Cantor H. Dysregulated expression of the T cell cytokine Eta-1 in CD4-8- lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *J Exp Med.* 1990;172:1177-1183
128. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061
129. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today.* 2000;21:475-478

130. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107:1055-1061.
131. Weber GF, Cantor H. Differential roles of osteopontin/Eta-1 in early and late lpr disease. *Clin Exp Immunol.* 2001;126:578-583.
132. Lampe MA, Patarca R, Iregui MV, Cantor H. Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease.
133. Iizuka J, Katagiri Y, Tada N et al. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest.* 1998;78:1523-1533.
134. Petrow PK, Hummel KM, Schedel J, Franz JK, Klein CL, Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Chang PL, Prince CW, Gay RE, Gay S. Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2000 Jul;43(7):1597-605.
135. High levels of osteopontin associated to polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity / lymphoproliferation. 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. *Blood.* 2004 Feb 15;103(4):1376-82. Epub 2003 Oct 30.
136. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 2001;294:1731-1735.
137. Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003 Jun;53(6):819-22.

138. Linnington C, Webb M, WoodhaSM PL. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 1984; 6 (6): 387-396
139. Schluesener HS, Sobel RA, Linnington C, Weiner HL. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 1987; 139 (12): 4016-4021
140. Rittling SR, Denhardt DT.: Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 1999; 7(2): 103-113
141. Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003 Jun;53(6):819-22.
142. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol.* 2003 Mar;136(1-2):125-9
143. Caillier S, Barcellos LF, Baranzini SE, Swerdlin A, Lincoln RR, Steinman L, Martin E, Haines JL, Pericak-Vance M, Hauser SL, Oksenberg JR; Multiple Sclerosis Genetics Group. Osteopontin polymorphisms and disease course in multiple sclerosis
144. Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonisconi S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur J Immunol.* 1996. 26: 2781-89.
145. Buonfiglio, D, Bragardo M, Bonisconi S, Redoglia V, Cauda R, Zupo S, Burgio VL, Wolff H, Franssila K, Gaidano G, Carbone A, Janeway CA jr, and Dianzani U. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eu J Immunol.* 1999. 29:2863-74.

146. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature*.1999. 397:263-66.
147. Donatella Buonfiglio, Manuela Bragardo, Valter Redoglia, Rosanna Vaschetto, Flavia Bottarel, Sara Bonisconi, Thea Bensi, Caterina Mezzatesta, Charles A.Janeway jr. and Umberto Dianzani. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 3463–3467.
148. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature*.1999. 397:263-66.
149. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity*. 1997. 7:445-50.
150. Kroczeck RA et al. Emerging paradigms of T cell co-stimulation. 2004. *Current opinion in immunology* 16. 321-327.
151. Harding FA, McArthur JG, Gross A, Raulet DH, and Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*.1992. 356:607-9.
152. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors. New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 29-53.
153. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity*. 1997. 7:445-50.
154. Kroczeck RA et al. Emerging paradigms of T cell co-stimulation. 2004. *Current opinion in immunology* 16. 321-327.
155. Beier KC. et al. Induction, binding, specificity and function of human ICOS. 2000. *Eur J Immunol* 30. 3707-3717

156. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999. 402. 827-832.
157. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14163-14168.
158. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature*.1999. 397:263-66
159. Riley JL. et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS and CTLA 4 receptors.2002. *PNAS* 99. 11790-11795.
160. Riley JL, Blair PJ, Musser JT et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol*. 2001;166:4943-4948
161. Riley J.L. and June C. H. The CD28 family: a T cell rheostat for therapeutic control of T cell activation. 2005. *Blood*. 105. 13-21.
162. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency.
163. Ueda H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. 423. 506-511
164. Ban Y. et al. Analysis of the CTLA-4, CD28 and ICOS genes in autoimmune thyroid disease. *Genes and Autoimmunity*, 2003. 4. 586-593.
165. Ihara K. et al. Association studies of CTLA-4, CD28 and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in Japanese population. *Immunogenetics*, 2001. 53. 447-454.
166. Huang et al., Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Feb;52(2):153-7.

167. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8.
168. Karandikar et al., CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):783-8.
169. Perrin et al., CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1333-6.
170. Khoury et al., Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness in vivo. 1995.
171. Miller et al., Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity*. 1995 Dec; 3(6):739-45.
172. Benjamin GS. et al. ICOS is essential for the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. 2004. *Journal of neuroimmunology*. 16-25.
173. Hideki F. et al. Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking activated T cells through inducible costimulatory molecule pathway. 2003. *Cardiovascular Research* 59. 95-104.
174. Nurieva R. et al. Inducible costimulator is essential for collagen induced arthritis. 2003. *J Clin Invest* 111. 701-706.
175. Okamoto T. et al. Expression and function of the costimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. 2003. *J Rheumatol* 30. 1157-1163.
176. Hutloff A. et al. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. 2004. *Arthritis and Rheumatism* 50. 3211-3220.
177. Ueda H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. 423. 506-511

178. Ban Y. et al. Analysis of the CTLA-4, CD28 and ICOS genes in autoimmune thyroid disease. *Genes and Autoimmunity*, 2003. 4. 586-593.
179. Ihara K. et al. Association studies of CTLA-4, CD28 and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in japanese population. *Immunogenetics*, 2001. 53. 447-454.
180. Haimila K et al. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes and immunity* 2004. 1-8
181. Rotmann JB. et al. The costimulatory molecules ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunol* 2001. vol 2. No 7. 605-611.
182. Dong C et a., ICOS costimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* 2001. 409. 97-101.
183. Sporici AR. et al., ICOS ligand costimulation is required for T cellencephalitogenicity. *Clinical Immunol* 2001. vol 100. No 3. 277-288.
184. Rotmann JB. et al. The costimulatory molecules ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunol* 2001. vol 2. No 7. 605-611
185. Sporici AR. et al., ICOS ligand costimulation is required for T cellencephalitogenicity. *Clinical Immunol* 2001. vol 100. No 3. 277-288.
186. Wiendl H et al. Muscle fibers and cultured muscle cells express the B7.1/2 related costimulatory molecole ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 2003.126. 1026-1035
187. Hemmer B et al. New concepts i the immunopathogenesis of the multiple sclerosis, 2002. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 291-301.
188. Lovett-Rache AE et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28 mediated costimulation in MS patients. A marker of memory/activated T cells. *J clin. invest.* 1998. 101. 725-730.
189. Markovic-Plese S et al. CD4+ CD28- costimulation independent T cells in MS. *J clin invest* 2001. 108. 1185-1194.

PUBBLICAZIONI

- **High levels of osteopontin associated to polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation.**
Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, **Castelli L**, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacobelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1376-82. Epub 2003 Oct 30.

- **Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression**
Chiocchetti A., PhD, MS, Comi C., MD, Indelicato M., MS, **Castelli L.**, PhD, Mesturini R., MS, Bensi T., MS, Sametti S., MS, Mazzarino M.C., MD, Giordano M., PhD, MS, D'Alfonso S., PhD, Momigliano-Richiardi P., PhD, Liguori M., MD, Santoro C., MD, Monaco F., MD, Leone M., MD, and Dianzani U., MD, PhD. *J Neuroimmunol*. 2005 Jun;163(1-2):172-8. Epub 2005 Apr 25.

- **Two snps in the 5' and 3' end of the opn (osteopontin) gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus.**
S. D'Alfonso, PhD, N. Barizzzone, BD, M. Giordano, PhD, A. Chiocchetti, PhD, C. Magnani, PhD, **L. Castelli**, BD, M. Indelicato, BD, F. Giacobelli, PhD, M. Marchini, PhD, R. Scorza, MD, M.G. Danieli, MD, M. Cappelli, MD, S. Migliaresi, MD, B. Bigliardo, MD, M.G. Sabbadini, MD, E. Baldissera, MD, M. Galeazzi, MD, G.D. Sebastiani, MD, G. Minisola, MD, R. Ravazzolo, MD, U. Dianzani, MD, P. Momigliano-Richiardi, PhD. *Arthritis Rheum*. 2005 Feb;52(2):539-47.

- **P-selectin glycoprotein ligand-1 variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in patients with multiple sclerosis.**
Scalabrini D, Galimberti D, Fenoglio C, Comi C, De Riz M, Venturelli E, **Castelli L**, Piccio L, Ronzoni M, Lovati C, Mariani C, Monaco F, Bresolin N, Scarpini E. *Neurosci Lett*. 2005 Nov 18;388(3):149-52.

- **T cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy**

C. Comi, MD, P. Gaviani, MD, M. Leone, MD, **L. Castelli**, MS, R. Mesturini, MS, G. Ubezio, MD, A. Chiochetti, MS, M. Osio, MD, F. Muscia, MD, G. Bogliun, MD, G. Corso, MD, A. Gavazzi, MD, C. Mariani, MD, R. Cantello, MD, PhD, F. Monaco, MD, U. Dianzani, MD, PhD. (J Peripher Nerv Syst. 2006 Mar;11(1):53-60)

- **Defective function of the Fas apoptotic pathway in type 1 diabetes mellitus correlates with age at onset**

Defranco S., Chiochetti A., Ferretti A., **Castelli L.**, Cadario F., Cerutti F., Rabbone I., Indelicato M., Mazzarino M.C., Chessa M., Bona G., Dianzani U. (submitted)

- **ICOS cooperate with CD28, IL-2 and IFN-g and modulates activation of human naïve CD4+ T cells.**

Mesurini R., Nicola S., Chiochetti A., Bernardone S., **Castelli L.**, Bensi T., Ferretti M., Comi C., Dong C., Rojo J. M., Yagis J. and Dianzani U. Eur J Immunol. 2006 Oct;36(10):2601-12

- **ICOS gene haplotypes correlate with Multiple Sclerosis development and progression and influence ICOS function.**

Castelli L., Comi C., Chiochetti A., Mesturini R., Nicola S., Galimberti D., Scarpini E, Rojo J. M., Yagi J., Perla F., Maurizio L., Monaco F., Dianzani U. (J. Neuroimmunology, in press)

- **A sequence variation in the MOG gene is involved in Multiple Sclerosis susceptibility**

D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzone N, Bocca S, Ferrante D, **Castelli L**, Ferrante P, Naldi P, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Trojano M, Momigliano-Richiardi P. (submitted)

- **Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model.**

Henderson WR Jr, Chi EY, Bollinger JG, Tien YT, Ye X, **Castelli L**, Rubtsov YP, Singer AG, Chiang GK, Nevalainen T, Rudensky AY, Gelb MH. J Exp Med. 2007 Apr 2; (in press)